

UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
FACULTAD DE BIOLOGIA



**IDENTIFICACION Y ORGANIZACION DE LOS COMPONENTES
CELULARES DEL TIMO DE LUBINA (*Dicentrarchus labrax L.*)**

Memoria que presenta **D. MARCELINO
AVILES TRIGUEROS** para optar al Grado de
Doctor en Biología por la Universidad de
Murcia.

Murcia, Abril 1993

2.4. TEJIDO CONECTIVO ASOCIADO AL TIMO.

El tejido conectivo de la cápsula conectiva y de las trabéculas del timo de lubina está separado de las células parenquimáticas por una capa simple de CER limitantes dispuestas sobre una membrana basal (Fig. 97). Ocasionalmente, esta capa limitante aparece interrumpida tanto a nivel de la cápsula conectiva (Fig. 70) como de las trabéculas (Fig. 69), permitiendo el tránsito de células entre el parénquima tímico y el tejido conectivo y viceversa.

2.4.1. CAPSULA CONECTIVA.

La membrana basal que separa el parénquima del tejido conectivo presenta una ultraestructura típica, con una capa transparente a los electrones y de aspecto granulado, lámina rara o lúcida, adyacente a las CER limitantes y la lámina densa, más próxima al tejido conectivo, de mayor grosor y

electronodensidad que la anterior (Figs. 97, 98). En las zonas alteradas por el paso de células, la membrana basal modifica su estructura, apareciendo formada por dos, tres o más líneas densas entre una sustancia finamente granular (Fig. 70). La membrana basal es continua con componentes fibrilares y sustancia fundamental amorfa de la matriz del tejido conectivo.

El tejido conectivo denso que rodea al timo presenta, como principal componente celular, fibrocitos que se distribuyen al azar y en todas direcciones; aunque en las áreas próximas al timo son más frecuentes y suelen asociarse para formar una hilera simple y discontinua, paralela a la membrana basal (Fig. 100).

Los fibrocitos (Fig. 100) son fusiformes, muy alargados, con prolongaciones muy delgadas en sus extremos, aunque también pueden observarse como células estrelladas. El núcleo es elíptico o irregular, dependiendo de la forma de la célula y con un nucléolo excéntrico y escasa heterocromatina de disposición periférica. En el citoplasma, cerca del núcleo, se observan un par de centriolos rodeados por un aparato de Golgi pequeño, los ribosomas libres se presentan en gran número agrupados en diferentes zonas del citoplasma. Los perfiles de RER son escasos y se caracterizan por tener, al igual que la membrana nuclear externa, abundantes ribosomas adheridos; estas cisternas pueden aparecer muy dilatadas presentando en su luz un material de mediana electronodensidad, lo que refleja una alta actividad de síntesis. Además

se observan numerosas vesículas de secreción algunas de ellas fusionadas con la membrana plasmática y abriéndose a la matriz extracelular. Las mitocondrias son pequeñas de forma redondeada y se localizan en el citoplasma perinuclear, aunque también pueden aparecer en las prolongaciones citoplasmáticas.

Cuando se examina la matriz extracelular del tejido conectivo con microscopía electrónica, se observa que está constituida por fibras colágenas, reticulares y elásticas y sustancia fundamental amorfa.

Las fibras colágenas (Figs. 98, 99) se disponen preferentemente en densas capas ligeramente onduladas y paralelas a las CER limitantes del timo, entre las que aparecen componentes celulares. Las fibras colágenas exhiben una secuencia de bandas transversales claras y oscuras a lo largo de ellas, que muestra la típica estriación descrita para este tipo de fibra y en algunas áreas forman haces más o menos gruesos, dentro de los cuales las fibras presentan un diámetro bastante uniforme, mientras que en otras áreas las fibras aparecen dispersas.

Las fibras reticulares (Fig. 98) se localizan principalmente en áreas próximas a las membranas basales limitantes del parénquima tímico y de los vasos sanguíneos y nervios. Están estrechamente relacionadas con las fibras de colágeno y suelen estar dispuestas en forma de red o dispersas.

Las fibras elásticas (Fig. 100) son menos numerosas que los otros dos tipos de fibras observados. Se disponen de forma irregular y aparecen en las

proximidades de los vasos y de los fibrocitos. Aparecen como una sustancia amorfa de baja electronodensidad, con una fina punteadura que se corresponde con las microfibrillas que integran este tipo de fibras.

La fina punteadura (Fig. 98) que se observa en la sustancia fundamental y entre las fibras se debe a moléculas de proteoglicanos componentes de la sustancia fundamental amorfa.

Con microscopía electrónica se identifican, en los espacios del tejido conectivo, células libres como linfocitos, granulocitos, macrófagos y mastocitos.

En las proximidades del parénquima se observan áreas con numerosas células linfoides infiltradas. Estas células presentan las características de los diferentes tipos de linfocitos descritos en el parénquima tímico; apareciendo, incluso, células en división (Fig. 99). También aparecen granulocitos maduros infiltrados, siendo más frecuentes los granulocitos eosinófilos que los heterófilos (Fig. 98).

Los macrófagos presentan ultraestructura similar a los descritos en el parénquima tímico, aunque su actividad fagocítica es menor.

Las células cebadas son de gran tamaño y forma ovalada con algunas ondulaciones superficiales. Núcleo redondeado o irregular, escasa heterocromatina periférica. El citoplasma es abundante y presenta un aparato de Golgi bien desarrollado, el RE es escaso y las mitocondrias, pequeñas y

redondeadas, son relativamente escasas. El rasgo ultraestructural más característico del citoplasma es el abundante número de gránulos limitados por membrana, con forma fusiforme u ovalada y aspecto homogéneo de electronodensidad elevada.

También aparecen nervios y vasos sanguíneos rodeados por membrana basal. La cápsula conectiva está bien vascularizada, siendo mayor la irrigación en la zona más próxima al parénquima tímico.

2.4.2. TRABECULAS.

Las trabéculas tímicas son continuas con el tejido conectivo subyacente de la cápsula conectiva (Fig. 98) y atendiendo a su tamaño y estructura distinguimos: primarias y secundarias.

Las trabéculas primarias (Fig. 101) penetran perpendicularmente a través del parénquima tímico y se ramifican, aproximadamente en ángulo recto, a nivel del límite entre la cápsula epitelial y la zona externa, causando la lobulación del timo. El espesor de las trabéculas primarias es variable disminuyendo progresivamente conforme se ramifican. En su interior pueden observarse vasos arteriales y venosos y haces nerviosos rodeados por tejido conectivo idéntico al de la cápsula conectiva.

Las trabéculas secundarias (Fig. 102) pueden originarse por ramificación de las trabéculas primarias o directamente de la cápsula conectiva. Se caracterizan por presentar menor longitud y espesor que las trabéculas primarias, por lo que no contribuyen a la lobulación del timo. En este tipo de trabéculas es de destacar la presencia de engrosamientos, con un mayor número de células en el tejido conectivo, observándose células en tránsito a través de la capa de CER limitantes (Fig. 69). Estas trabéculas se adentran en el parénquima y se bifurcan en trabéculas más delgadas con capilares arteriales (Fig. 103) o venosos (Fig. 104) y escaso tejido conectivo, formado por fibroblastos y matriz extracelular con fibras colágenas y reticulares que pueden llegar a desaparecer prácticamente en las trabéculas secundarias más delgadas que sólo contienen un capilar (Fig. 105).

2.5. VASCULARIZACION.

La vascularización del timo de lubina está constituida por ramificaciones de los vasos que irrigan el tejido conectivo subyacente; estas ramificaciones se adentran en el órgano asociadas a las trabéculas primarias y secundarias, que sólo son abandonadas por delgados capilares a nivel de la zona

interna.

Por las trabéculas primarias discurren paralelamente capilares arteriales y venosos (Fig. 101), mientras que las trabéculas secundarias presentan un único capilar (arterial o venoso) (Figs. 103, 104). A nivel de las trabéculas, los vasos sanguíneos están rodeados por una capa de tejido conectivo que se atenúa progresivamente, llegando prácticamente a desaparecer en las trabéculas de menor grosor; así el lumen vascular queda separado de los timocitos por las siguientes capas: endotelio, membrana basal del endotelio, un espacio perivascular ocupado por tejido conectivo, membrana basal de las CER limitantes y CER limitantes. Estas estructuras constituyen una verdadera barrera hematotímica a nivel de las trabéculas.

La capa de tejido conectivo, alrededor de los vasos más grandes (Figs. 101, 102), es gruesa y celular pudiendo haber distintos tipos celulares como: linfocitos, granulocitos, macrófagos, eritrocitos y células propias del tejido conectivo; conforme se atenúa el diámetro de los capilares intratrabeculares (Figs. 103, 104) la capa de tejido conectivo perivascular disminuye de grosor y pierde el componente celular, quedando únicamente la matriz extracelular (fibras colágenas y reticulares y sustancia fundamental) que disminuye progresivamente en espesor en relación con la reducción del calibre de los capilares (Figs. 105, 106).

La pared de los capilares intratrabeculares arteriales y venosos está

formada por células endoteliales envueltas externamente por una membrana basal continua. Los capilares arteriales (Fig. 103) presentan una luz reducida, el endotelio es cúbico con las células unidas entre sí por zónulas ocludens y pequeños desmosomas, núcleo ligeramente indentado eucromático, con escasa heterocromatina marginal, en el citoplasma aparece un aparato de Golgi de escaso desarrollo en posición yuxtannuclear y en la región citoplasmática periférica aparecen elementos tubulares de RE poco desarrollados. También hay unas pocas mitocondrias alargadas; además, en algunas secciones, aparecen pequeños gránulos electronodensos redondeados, aunque son muy raros. Un rasgo llamativo es la presencia en su citoplasma de abundantes vesículas y de una población de vesículas de plasmalema, que aparecen en las membranas plasmáticas tanto adluminal como abluminal, abriéndose a la luz capilar y al espacio extravascular, respectivamente. También aparecen en su citoplasma cortos haces de microfilamentos. Mientras que los capilares venosos (Fig. 104) se caracterizan por presentar una mayor luz y un perfil luminal más irregular con pliegues marginales en las uniones celulares, el endotelio está formado por células planas que presentan una región nuclear más engrosada que la periférica, más delgada, con núcleo aplanado de contorno irregular con una banda de heterocromatina periférica. Los orgánulos citoplasmáticos son escasos, sobresaliendo un gran número de vesículas de pinocitosis relacionadas con la membrana y algunos haces de microfilamentos más patentes en la periferia.

Asociados a la pared externa de los capilares se encuentran pericitos, que extienden sus prolongaciones entorno a los capilares de forma discontinua. Los pericitos (Fig. 103) presentan como característica ultraestructural más destacada la presencia de vesículas de pinocitosis en el citoplasma, que suelen estar asociadas a las membranas plasmáticas interna y externa en la que aparecen en mayor número. También se observan numerosos ribosomas libres en su citoplasma.

En la zona interna del parénquima tímico, los capilares pierden la capa conectiva acompañante y se extienden fuera de las trabéculas como capilares continuos muy finos y constituidos por una única célula endotelial muy aplanada, rodeada por la membrana basal y una capa de CER limitantes (Fig. 106). Esta capa es discontinua (Fig. 107) o no aparece en los capilares terminales (Fig. 108). En los capilares parenquimáticos, por tanto, la relación hemato-tímica es más directa y permite el paso de células en ambos sentidos.

Lámina XLVII.

Figura 97. Zona interna profunda. Trabéculas secundarias (t) en secciones transversal y longitudinal. Cápsula conectiva (CC). CER limitantes (ERl). Membrana basal (mb). Linfocitos (L). CER oscuras (ERo). Haces de tonofilamentos (tf). Desmosomas (d). Vasos sanguíneos (V). x2.500.

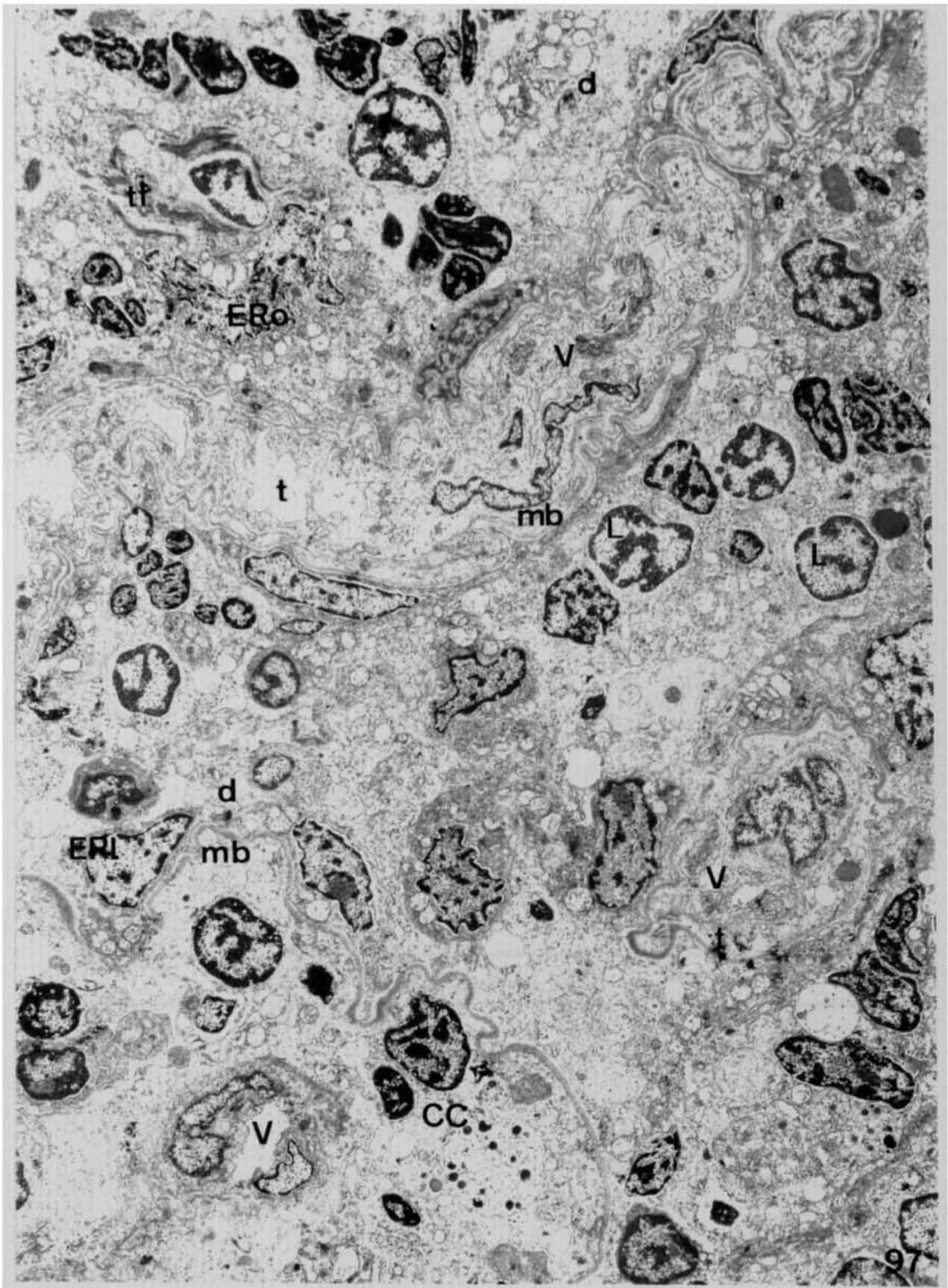


Lámina XLVIII.

Figura 98. Obsérvese la continuidad de la cápsula conectiva (CC) con las trabéculas (t). Granulocitos eosinófilos (Eo). Fibras colágenas (fc). Fibras reticulares (fr). Vasos sanguíneos (V). Zona interna (ZI). Linfoblastos (Lb). x4.000.

Figura 99. Infiltración linfoide de la cápsula conectiva. Linfocitos (L). Mitosis (mi). Haces de fibras colágenas (fc). x3.750.

Figura 100. Cápsula conectiva (CC). Nótese la disposición de los fibrocitos (F) en la región próxima al parénquima tímico (T). Linfocitos (L). Fibras colágenas (fc). Fibras elásticas (fe). x3.000.

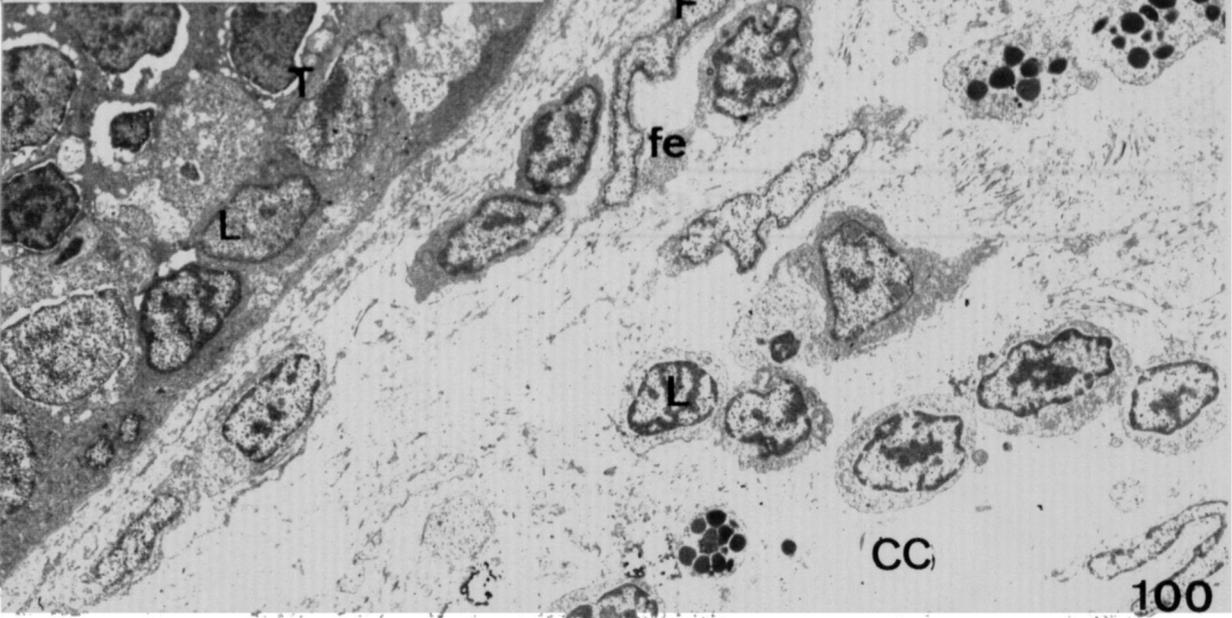
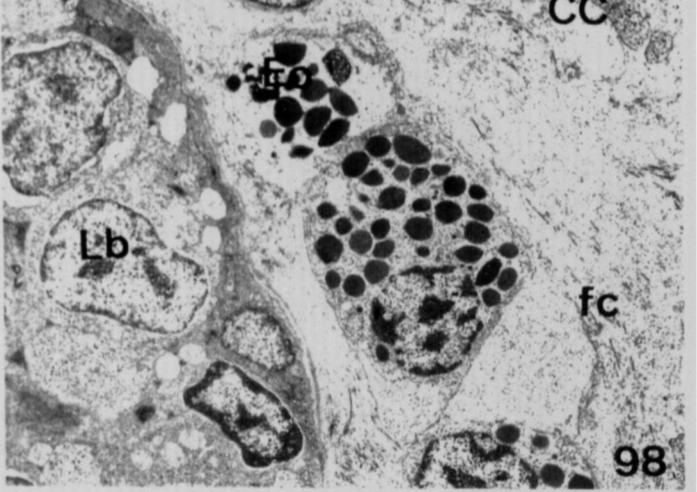
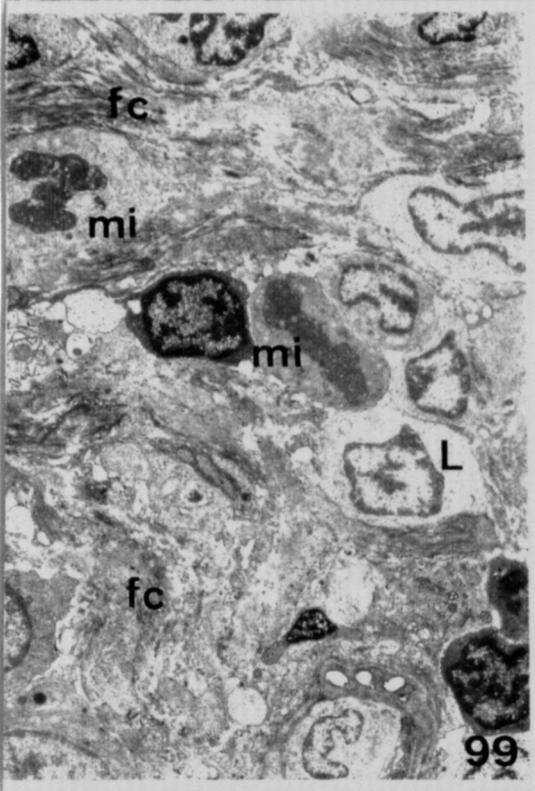
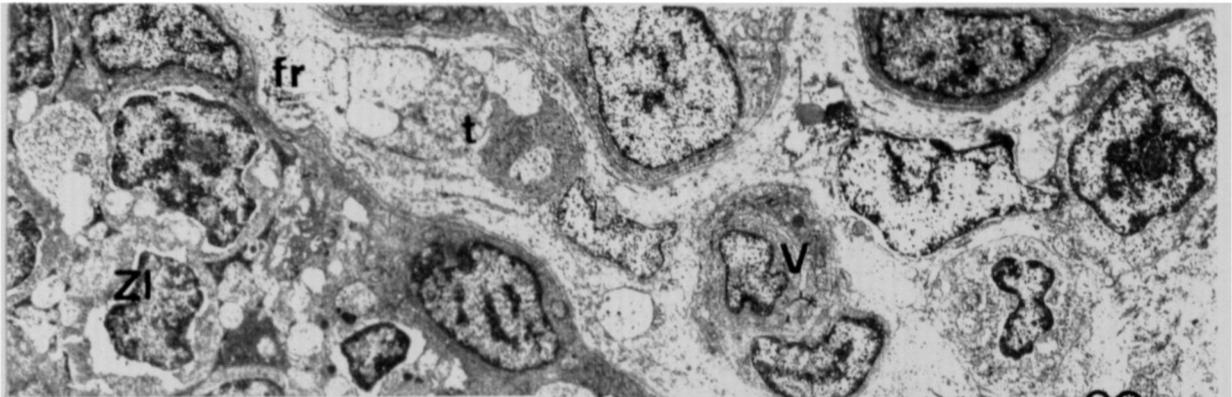


Lámina XLIX.

Figura 101. Sección transversal de una trabécula primaria de la zona externa. Vasos arterial (A) y venoso (V). Espacio perivascular (SPV). Membrana basal de la trabécula (mbt) y del vaso (mbv). Fibras colágenas (fc) y reticulares (fr). Linfocitos (L). CER limitante (ERI). Desmosomas (d). Interdigitaciones (†). x7.500.

Figura 102. Sección transversal de una trabécula secundaria de la zona externa. Con un único vaso sanguíneo, el resto de componentes es igual al de la figura anterior. x7.500.

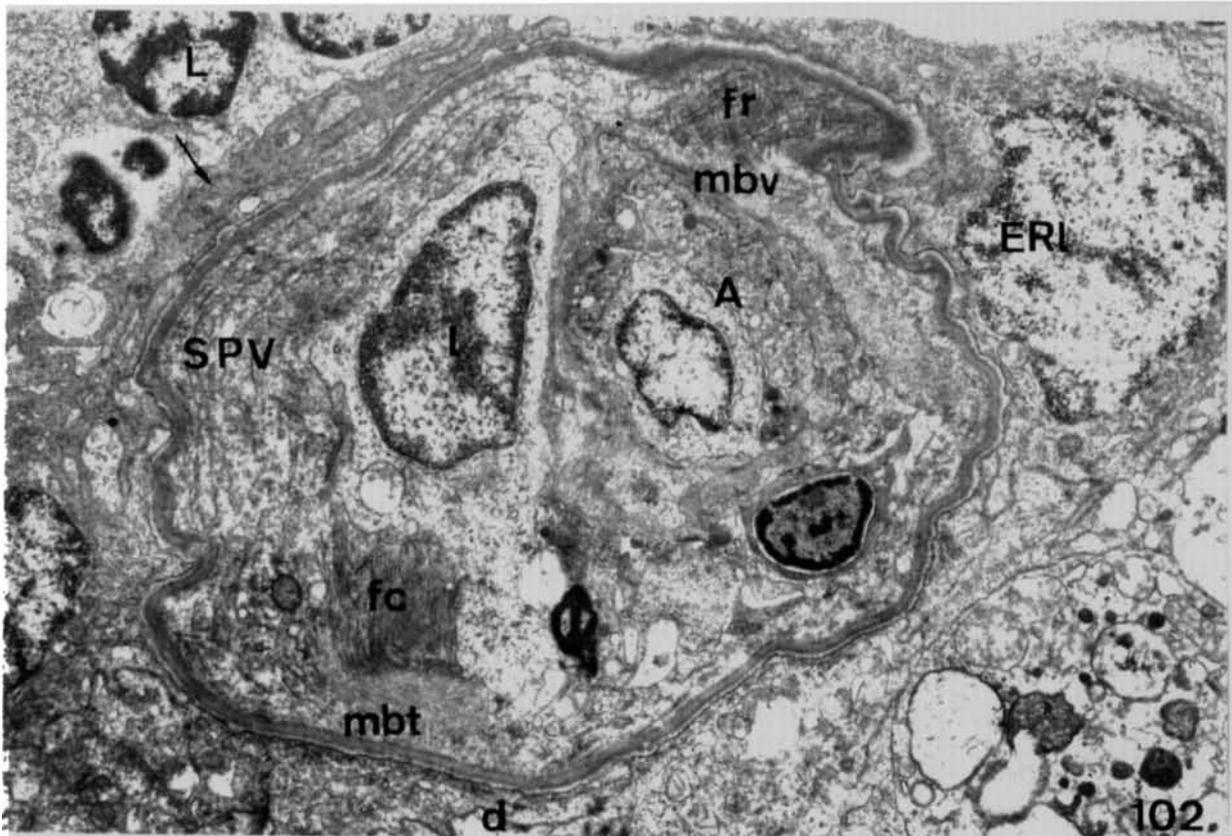
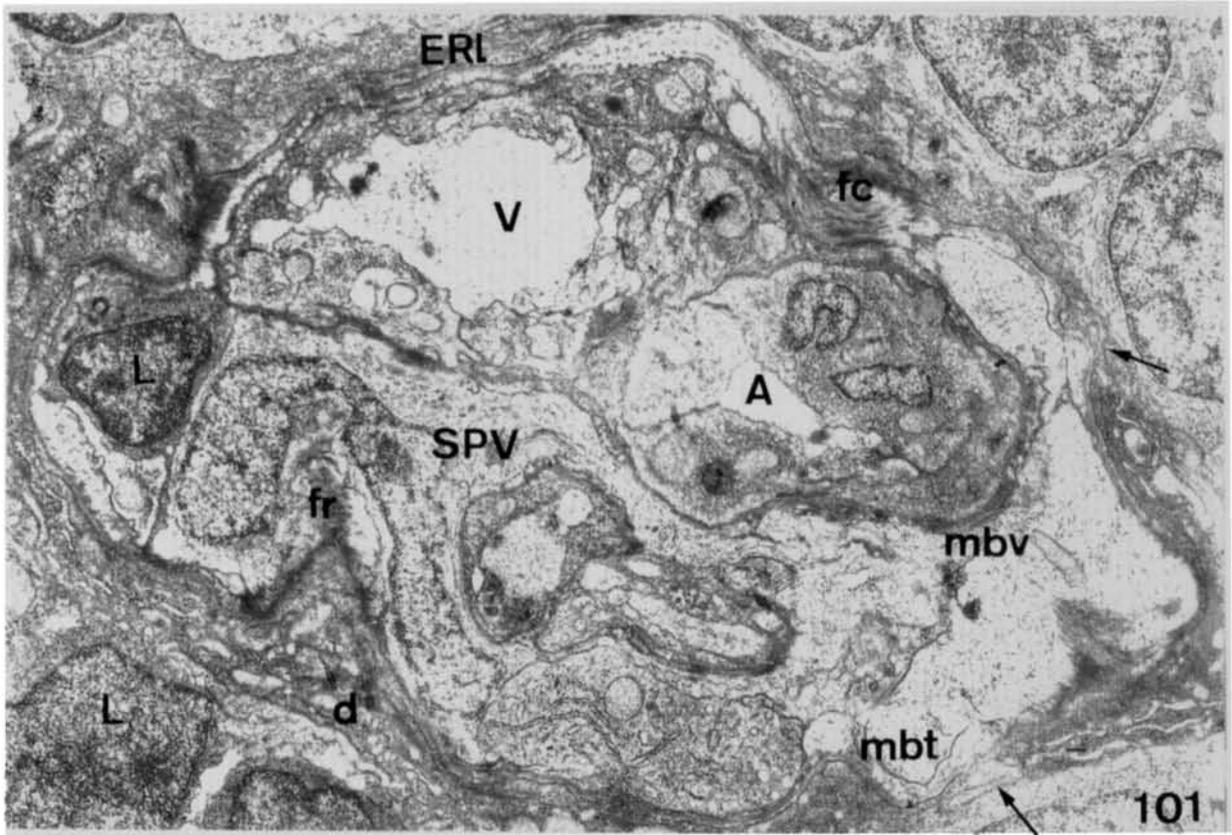


Lámina L.

Figura 103. Zona externa. Sección transversal de una trabécula secundaria con un capilar arterial. Pericito (P). Membranas basales del vaso (mbv) y de la trabécula (mbt). CER limitantes (ERI). Desmosomas (d). Interdigitaciones (†). x7.500.

Figura 104. Sección transversal de una trabécula secundaria del parénquima tímico de la zona interna con un capilar venoso. Nótese la presencia de pliegues marginales (▲) en las células endoteliales (En) y la ausencia de células en el espacio perivascular. x8.750.

Figura 105. Zona interna. Sección transversal de una trabécula secundaria con un delgado capilar arterial y escaso espacio perivascular. x7.500.

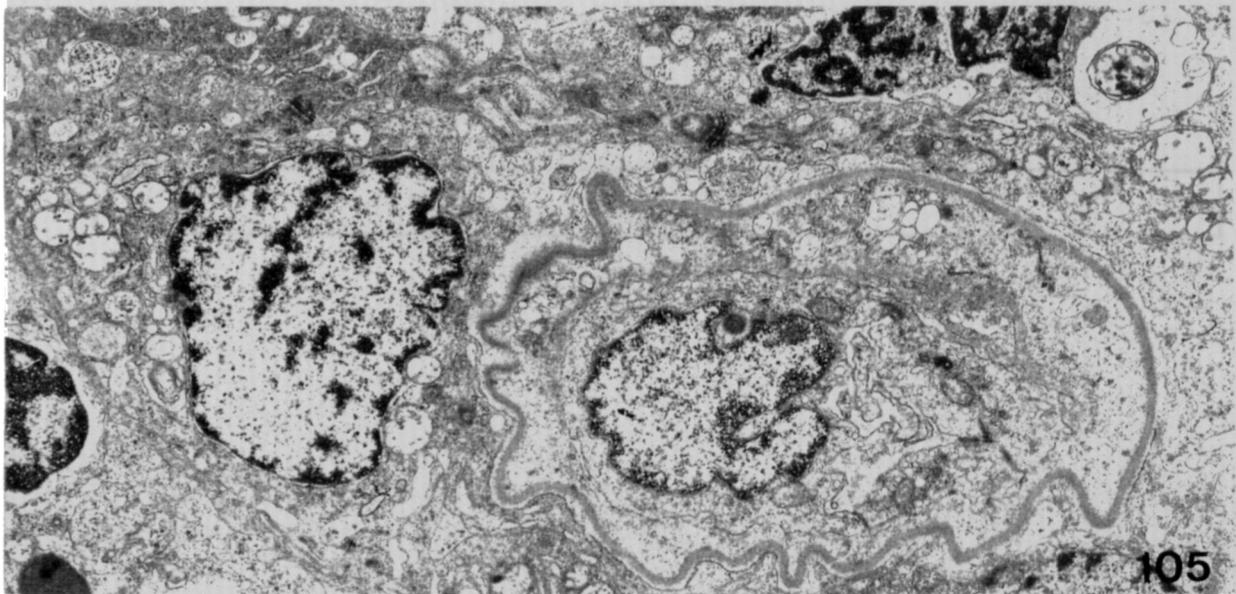
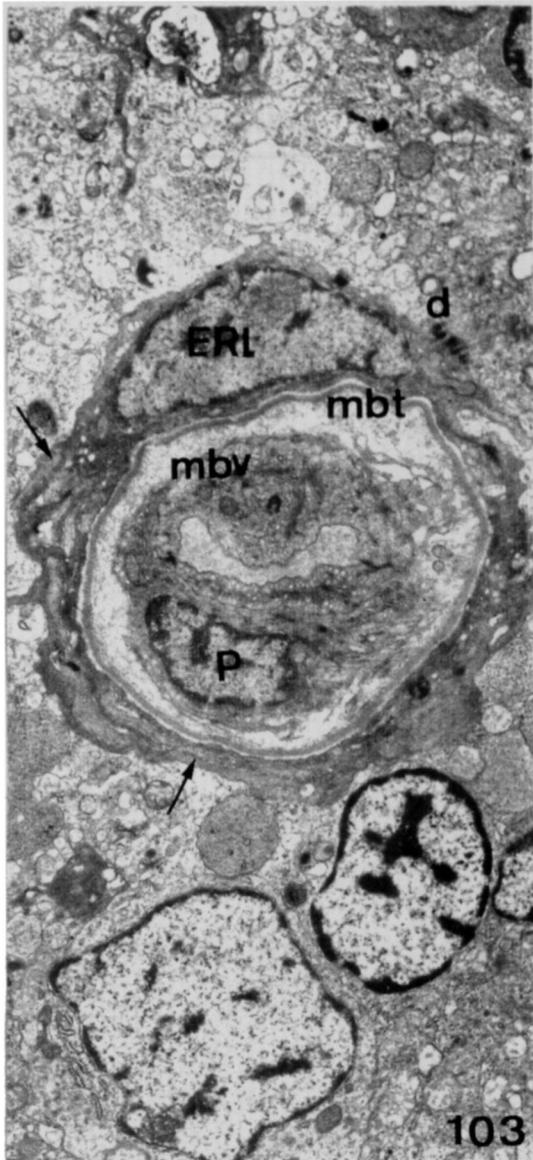


Lámina LI.

Figura 106. Detalle de la zona interna. Trabécula secundaria con un delgado espacio perivascular. Capilar (C). CER limitante (ERl). CER clara (ERc) que presenta una gran vacuola (v) con microvellosidades luminares (▲). Desmosomas (d). Interdigitaciones (†). x12.000.

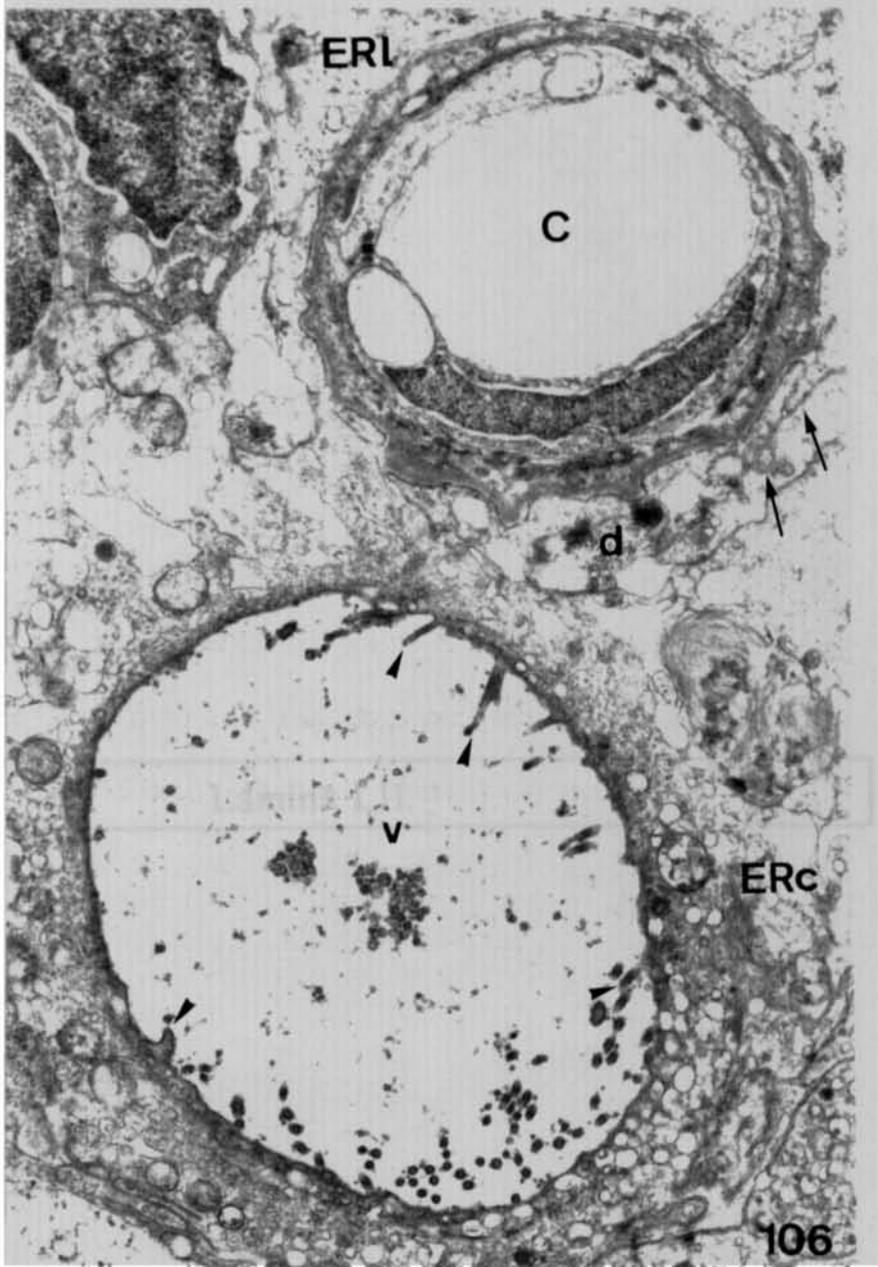
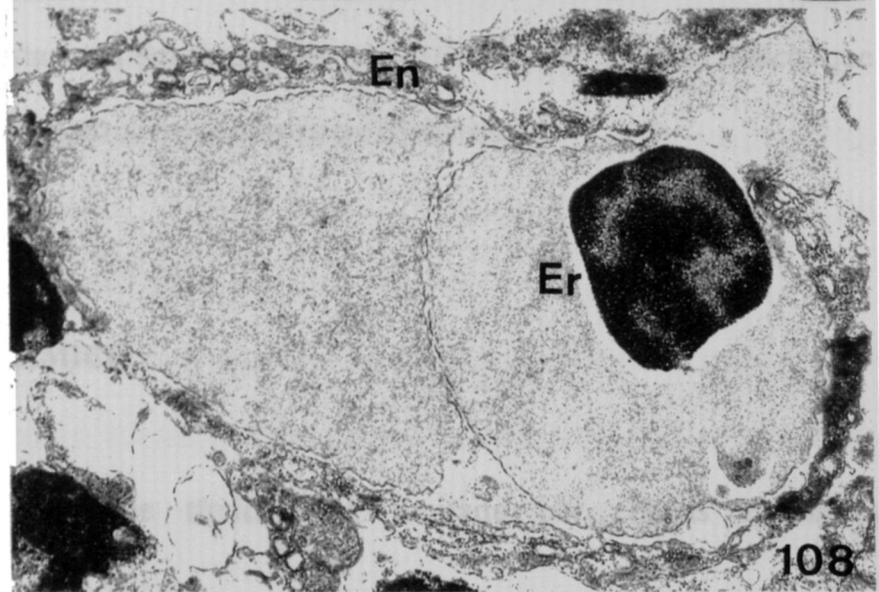
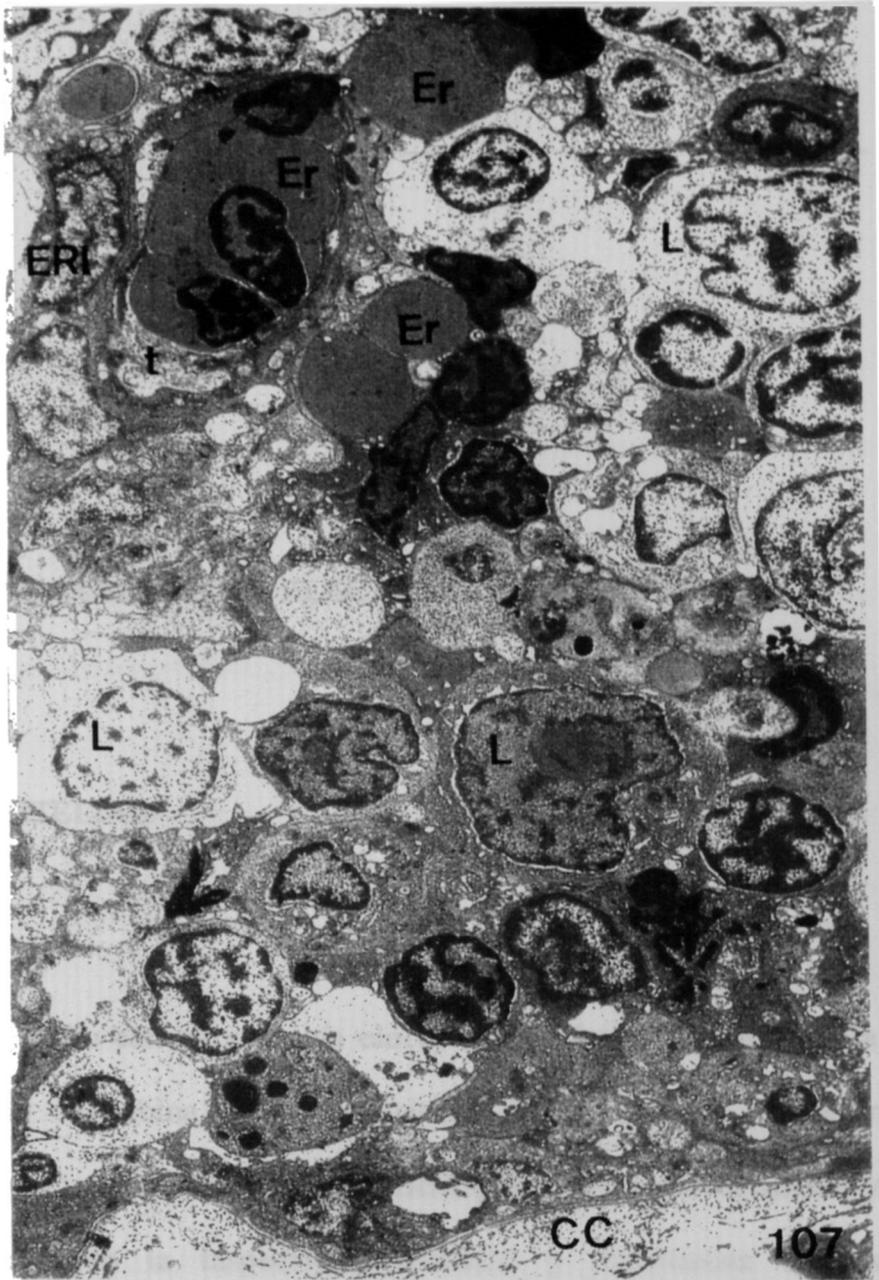


Lámina LII.

Figura 107. Zona interna profunda. Obsérvese una delgada trabécula (t) limitada por una capa de CER limitantes (ERl) discontinua que permite el tránsito de eritrocitos (Er). Linfocitos (L). Cápsula conectiva (CC). x3.000.

Figura 108. Zona interna. Detalle de un capilar sin envoltura epitelio reticular con un eritrocito (Er) extravasándose. Endotelio (En). x12.500.



3. ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

3.1. CAPSULA EPITELIAL.

El estudio con microscopía electrónica de barrido de la cápsula epitelial del timo de lubina nos proporciona, un medio para observar tridimensionalmente la ultraestructura superficial y la distribución de células y estructuras, permitiendo la inspección cualitativa y cuantitativa de los componentes de esta zona del timo y, en particular, los del epitelio tímico, que no son posibles de alcanzar por otros procedimientos.

3.1.1. EPITELIO TIMICO.

La superficie tímica está limitada por células epiteliales

pavimentosas de forma poligonal (exagonal y pentagonal, predominantemente), de $10,0 \pm 2,5$ y $9,25 \pm 1,0$ μm de ejes mayor y menor, respectivamente (Fig. 109). La membrana plasmática apical presenta característicos micropliegues de disposición laberintiforme (Figs. 109, 110).

La capa epitelial está interrumpida por criptas formadas por aumento de los espacios intercelulares o por invaginación de la superficie lateral de las células epiteliales. Estas estructuras aparecen distribuidas de forma uniforme, aproximadamente una cada $400 \mu\text{m}^2$ de área superficial de epitelio tímico, y tienen forma, tamaño y profundidad variables. Las criptas están ocupadas por células de cloruro, macrófagos o células mucosas (Fig. 109).

Las células de cloruro se caracterizan por una superficie lisa que, generalmente, presenta en el área central material vesicular emergiendo y/o cortas y escasas proyecciones digitiformes, que pueden corresponder a cortas microvellosidades de estas células (Fig. 110).

Los macrófagos superficiales aparecen ocasionalmente y se observan como largas proyecciones ramificadas que terminan en pequeños engrosamientos esféricos, que se corresponderían con las proyecciones del citoplasma apical de estas células, previamente descritas (Fig. 110).

Las células mucosas secretan, frecuentemente, material de secreción que recubre totalmente las criptas y, parcialmente, a las células epiteliales adyacentes, en las que pueden aparecer pequeñas gotas de

mucosustancia rellenoando el espacio existente entre los micropliegues (Fig. 111).

3.1.2. REGION SUBEPITELIAL.

Secciones perpendiculares y paralelas al epitelio tímico permiten el estudio de la zona subepitelial con microscopía electrónica de barrido.

En el parénquima de esta zona se observa el estroma epitelio reticular formado por células con gruesos somas y anchas prolongaciones citoplasmáticas que se estrechan en los extremos, por donde se relacionan entre sí y con las células epiteliales, y numerosas células linfoides pequeñas, $3,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$, redondeadas, de superficie lisa, que se alojan entre las prolongaciones de las CER (Fig. 112).

Adosadas al epitelio tímico aparecen grandes células mucosas de forma ovalada y tamaño aproximadamente de $10,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$, que se caracterizan por presentar una superficie ligeramente rugosa (Fig. 113).

También se observan grandes células redondeadas de aproximadamente $7,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de diámetro con microvellosidades, proyecciones citoplasmáticas esféricas y/o pliegues superficiales de tamaño y número variables, que identificamos como macrófagos. Estas células aparecen dispersas por todo el parénquima (Fig. 113).

El límite entre la zona externa y la cápsula epitelial está marcado por la presencia de una red de trabéculas de disposición paralela a la superficie tímica y revestidas por CER limitantes. A través de los huecos de esta trama, se continua el parénquima tímico de la zona externa y el de la cápsula epitelial (Fig. 114).

3.2. ZONA EXTERNA.

Las micrografías electrónicas de barrido muestran que la preparación de las muestras arrastra muchas de las células libres que componen el parénquima tímico, poniendo de manifiesto la citoarquitectura del estroma tímico. Las CER de la zona externa son de forma irregular y emiten largas prolongaciones citoplasmáticas aplanadas que se extienden en todas direcciones y forman una delicada red tridimensional constituida, principalmente, por prolongaciones citoplasmáticas de CER que interaccionan entre sí delimitando espacios libres regulares, similares a las celdas de un panal, en los que se ubican células linfoides, que contactan con las CER a través de amplias áreas de superficie, lo que da a esta zona del timo de lubina una apariencia compacta (Fig. 115).

La población de células linfoides de la zona externa está constituida por linfocitos pequeños ($3,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de diámetro), principalmente, y medianos ($4,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ de diámetro) con superficie lisa, que aparecen como células redondeadas ocupando los espacios libres del citoretículo. Estas células están empaquetadas de forma ajustada en oquedades del soma y prolongaciones citoplasmáticas de las CER, sin dejar espacios intercelulares. La superficie celular es lisa, aunque también se puede observar la presencia de cortas microvellosidades en la superficie de algunas células, diferencia estructural que sugiere distintos estadios de diferenciación (Fig. 115).

También aparece un tipo de interacción más íntima, en donde varias CER envuelven a células linfoides. Estos complejos linfoepiteliales (Fig. 116) presentan forma esférica y una superficie externa con lóbulos que se corresponden con la localización interna de linfocitos. En algunas de estas estructuras se observan aberturas superficiales que son atravesadas por linfocitos en tránsito. La morfología de estas estructuras varía dependiendo del número de células linfoides y de aberturas. Cuando los poros son numerosos, los linfocitos son escasos en su interior y estas estructuras tienen forma irregular.

Al igual que en la cápsula epitelial también se observan macrófagos dispersos entre las células libres que componen el parénquima (Fig. 117).

3.3. ZONA INTERNA.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido corroboran que el parénquima de la zona interna no presenta ninguna estructura limitante con la zona externa, existiendo una transición progresiva entre ambas zonas. La zona interna se encuentra separada de la cápsula conectiva por una capa continua de CER limitantes, con sus ejes longitudinales orientados en la misma dirección. Las CER limitantes son aplanadas, de aspecto pavimentoso, débilmente engrosadas por la presencia del núcleo, y ligeramente alargadas. Estas células presentan escasas y largas prolongaciones citoplasmáticas, que atenúan su grosor hacia los extremos y contactan con las CER del estroma (Fig. 118).

En la zona interna son frecuentes las trabéculas de diferentes tamaños (Fig. 119); en las de menor tamaño se pueden observar engrosamientos recubiertos con una estructura similar al resto de la trabécula, a través de los cuales se observan células en tránsito (Fig. 120). Las trabéculas están íntimamente relacionadas con una trama citoreticular más densa que en la zona externa, constituida por CER con un grueso soma unidas entre sí por varias prolongaciones citoplasmáticas, algunas de las cuales interaccionan con las CER limitantes peritrabeculares (Fig. 119).

Ocasionalmente, se observan células de tamaño similar al de los linfocitos con una superficie fenestrada por numerosos poros de diámetro relativamente grande. Este tipo de estructura superficial se corresponde con las fases terminales de células en apoptosis (Fig. 120).

El número de linfocitos con microvellosidades es mayor que en otras zonas del timo (Fig. 121).

Las células interdigitadas son características de esta zona, se localizan próximas a la zona externa y presentan un gran soma del que parten proyecciones citoplasmáticas que se interdigitan con otras células envolviéndolas (Fig. 122). Además, se observan estructuras aplanadas e irregulares agrupadas, que podrían corresponder a posibles células necrobióticas, y macrófagos en sus proximidades (Fig. 123).

3.4. CAPSULA CONECTIVA.

Las imágenes de microscopía de barrido de la cápsula conectiva muestran una estructura laminar formada por haces fibrilares. Las laminas se disponen paralelas y en algunas zonas se ramifican o anastomosan relacionando las distintas capas entre sí (Fig. 124).

Es frecuente la presencia de pequeñas células linfoides redondeadas, similares a las observadas en el parénquima tímico, que corresponden a la infiltración linfoide de esta zona del timo de lubina.

Lámina LIII.

Figura 109. Superficie del epitelio tímico de lubina. Obsérvese la disposición laberintiforme de los micropliegues (▲) de la membrana apical de las células epiteliales (e), las aberturas superficiales de las criptas epiteliales (†) y las proyecciones citoplasmáticas de macrófagos superficiales (Ms).
x2.700.

Figura 110. Detalle de la superficie del epitelio tímico. Proyecciones citoplasmáticas de un macrófago superficial (Ms). Cripta epitelial (Cp) con una célula de cloruro (Cl) en su base. Nótese la presencia de pequeñas vesículas (▲) y cortas microvellosidades (†) en la superficie apical de la célula de cloruro. Micropliegues de células epiteliales (▲).
x13.500.

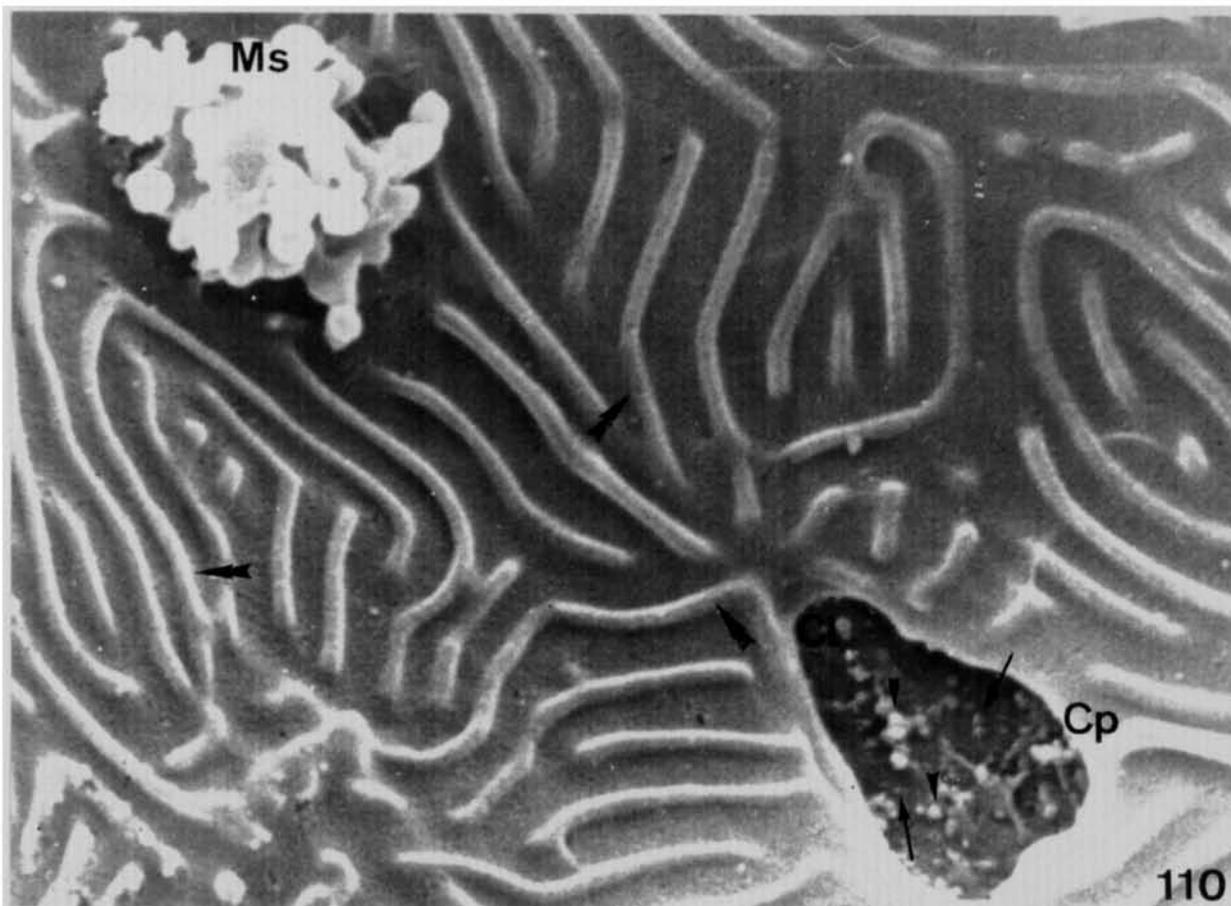


Lámina LIV.

Figura 111. Epitelio tímico. Se observan acúmulos de secreción mucosa (sm) sobre la superficie de las células epiteliales (e). x3.750.

Figura 112. Cápsula epitelial de un área marginal del timo de lubina. Epitelio tímico (ET). Región subepitelial (SE). Trabécula primaria (t1). Trabécula secundaria (t2). Células epitelio reticulares (ER). Linfocitos (L). Macrófagos (M). x2.800.

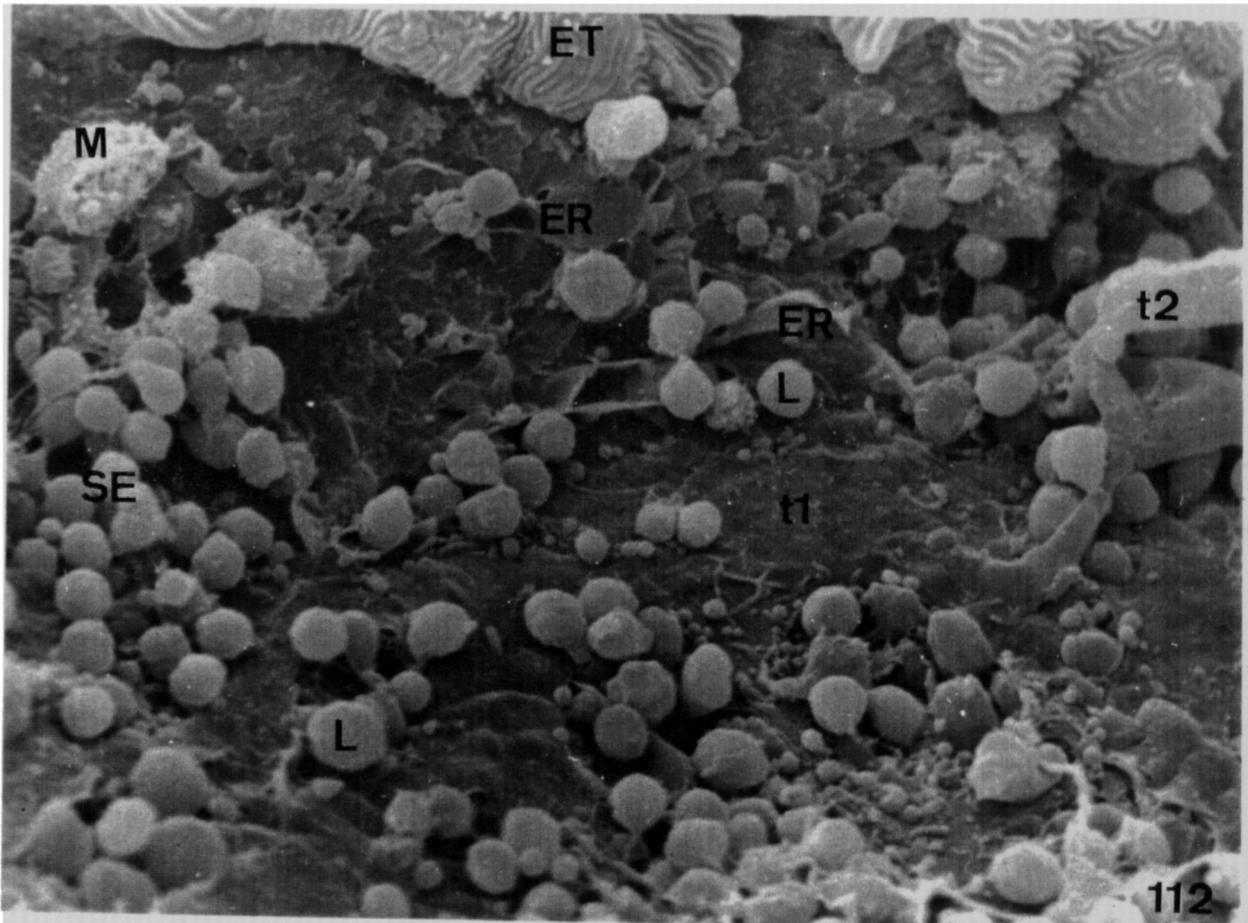
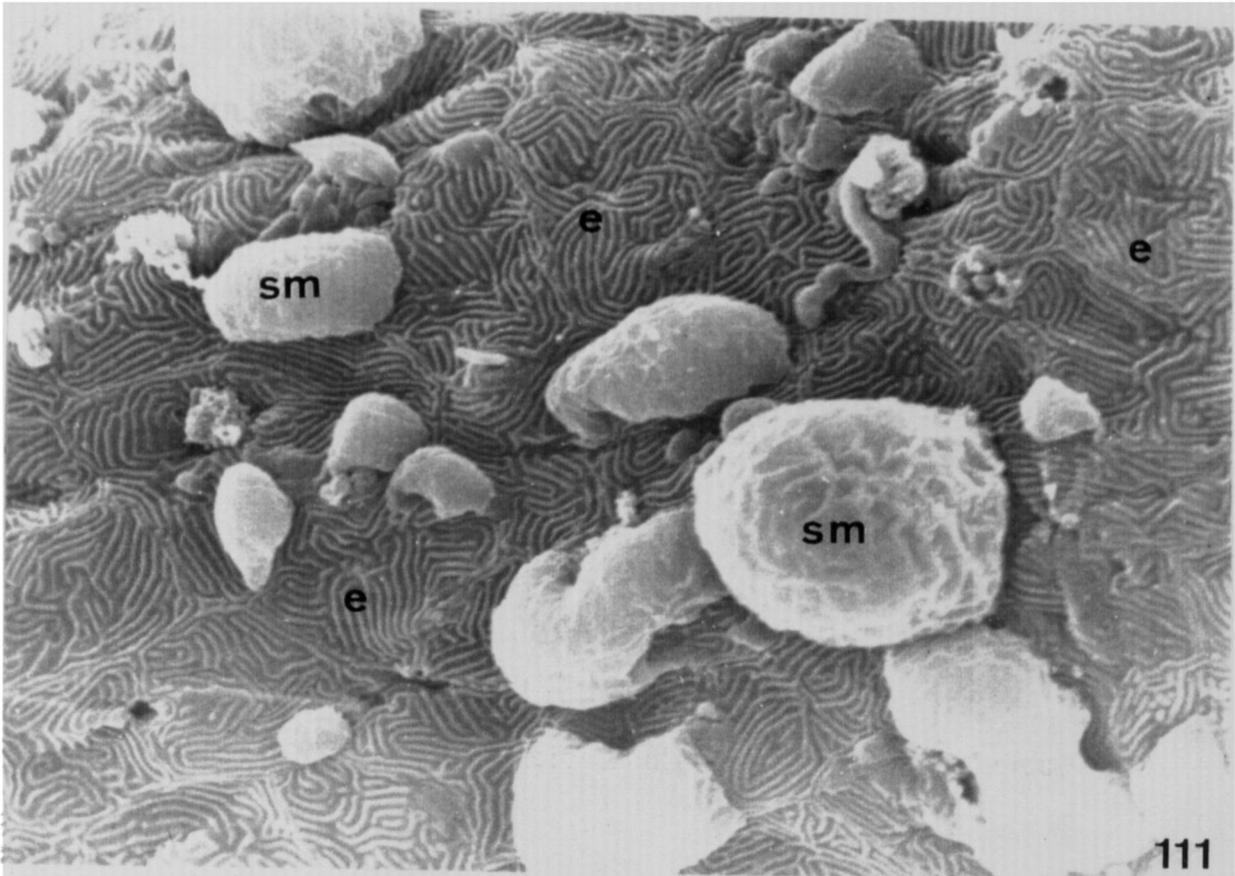


Lámina LV.

Figura 113. Detalle de la cápsula epitelial. Epitelio tímico (ET). Región subepitelial (SE). Células mucosas (Mu). Linfocitos (L). Macrófago (M). x4.700.

Figura 114. Red trabecular en el límite de la cápsula epitelial y la zona externa en el área central del timo de lubina. Nótese las relaciones (†) entre las células epitelio reticulares (ER). Trabéculas (t). Linfocitos (L). x2.100.

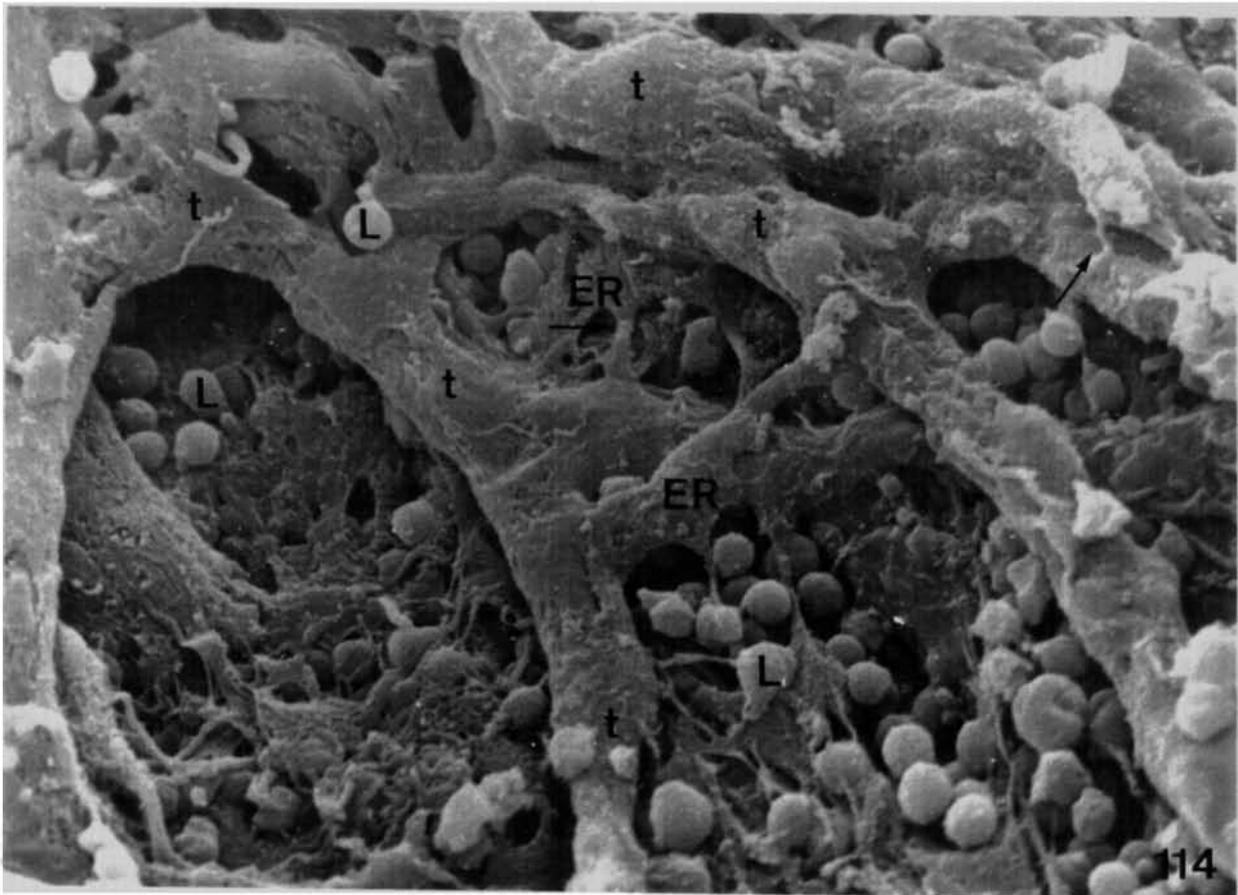
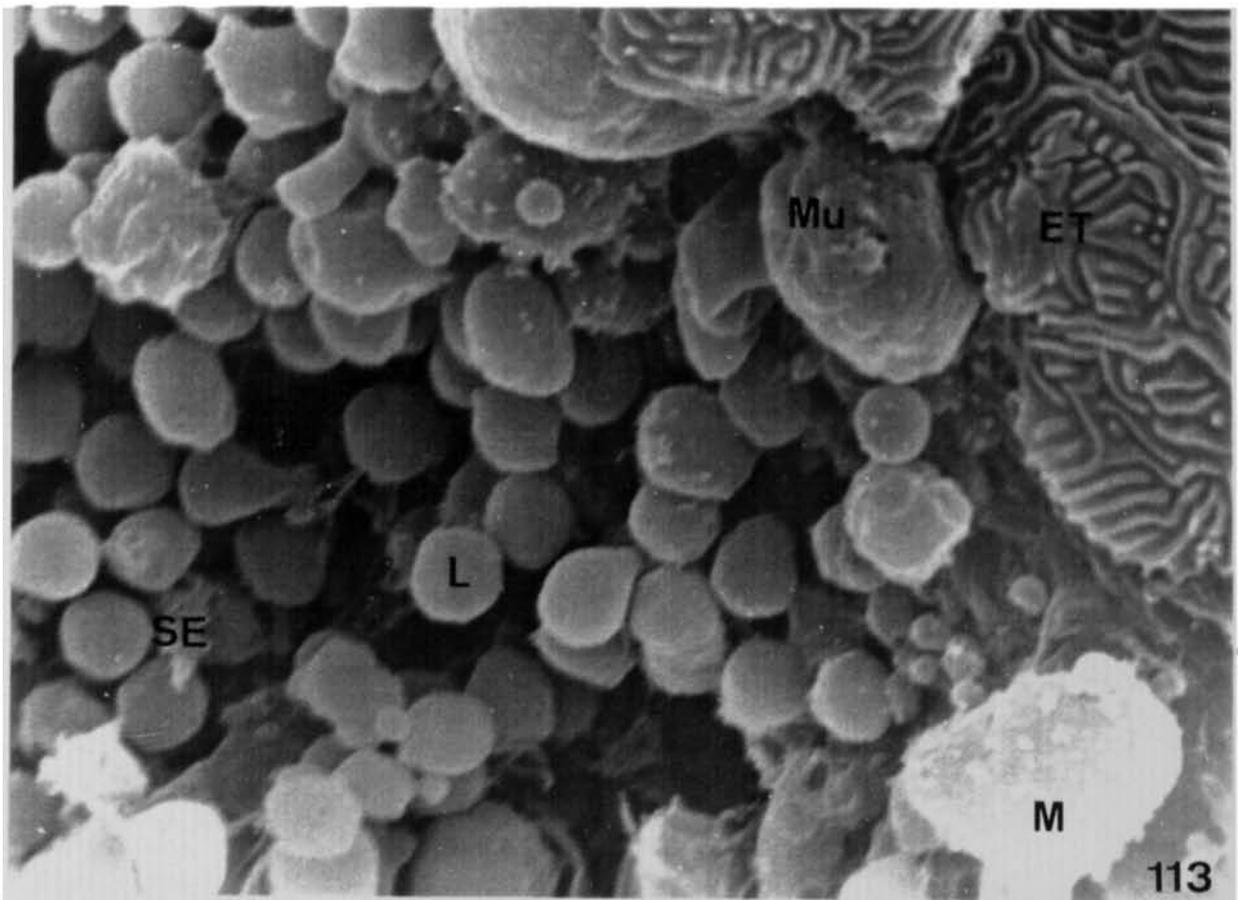


Lámina LVI.

Figura 115. Zona externa del timo de lubina. Los linfocitos (L) aparecen empaquetados entre las células epitelio reticulares (ER). En algunos linfocitos se aprecian microvellosidades cortas (†) . x3.750.

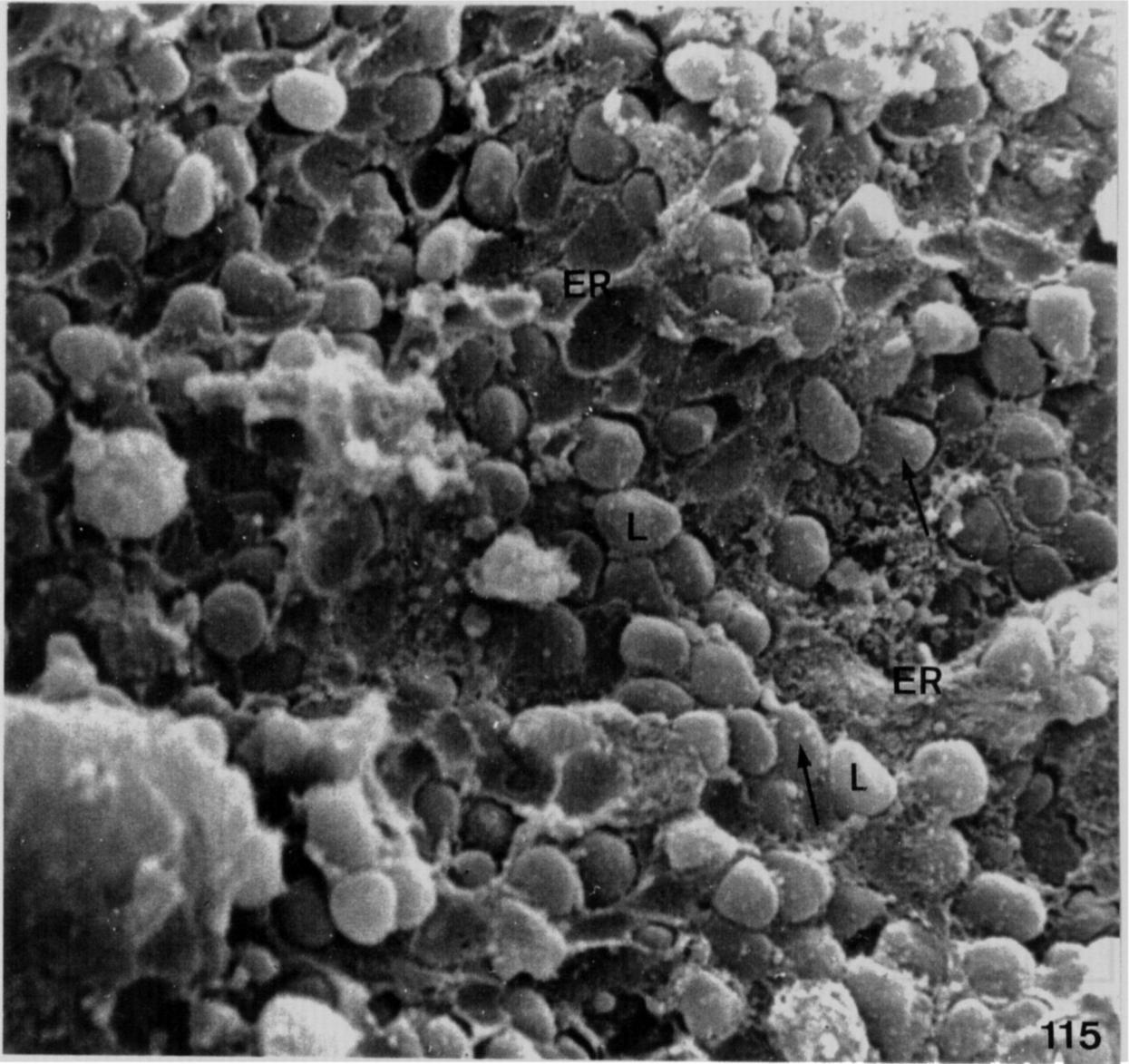


Lámina LVII.

Figura 116. Complejo linfoepitelial (CLE). Obsérvese el tránsito (†) de linfocitos (L) a través de su superficie. Células epitelio reticulares (ER). x2.700.

Figura 117. Macrófago (M) de la zona externa del timo. Linfocitos (L). x12.800.

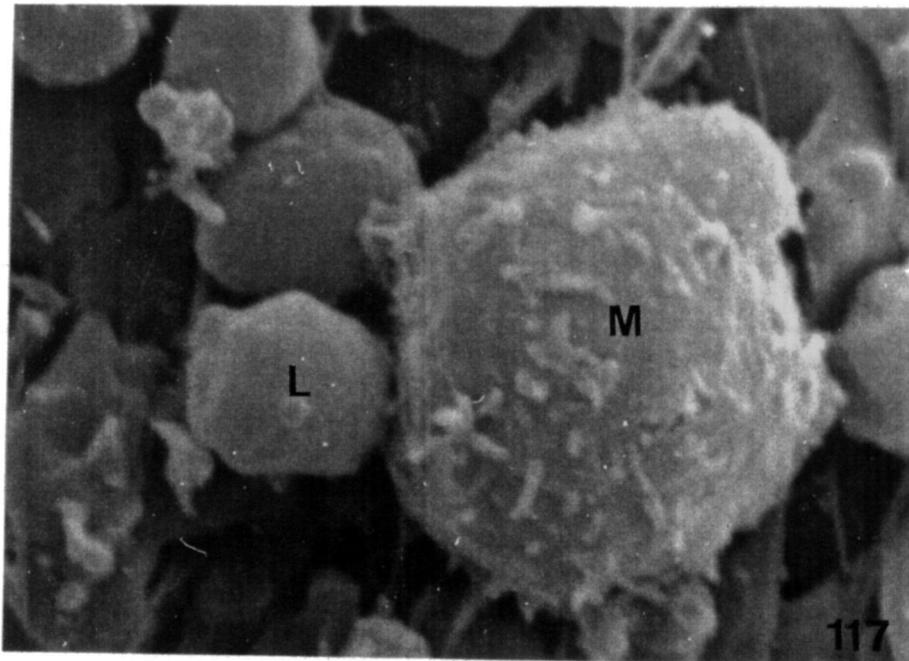
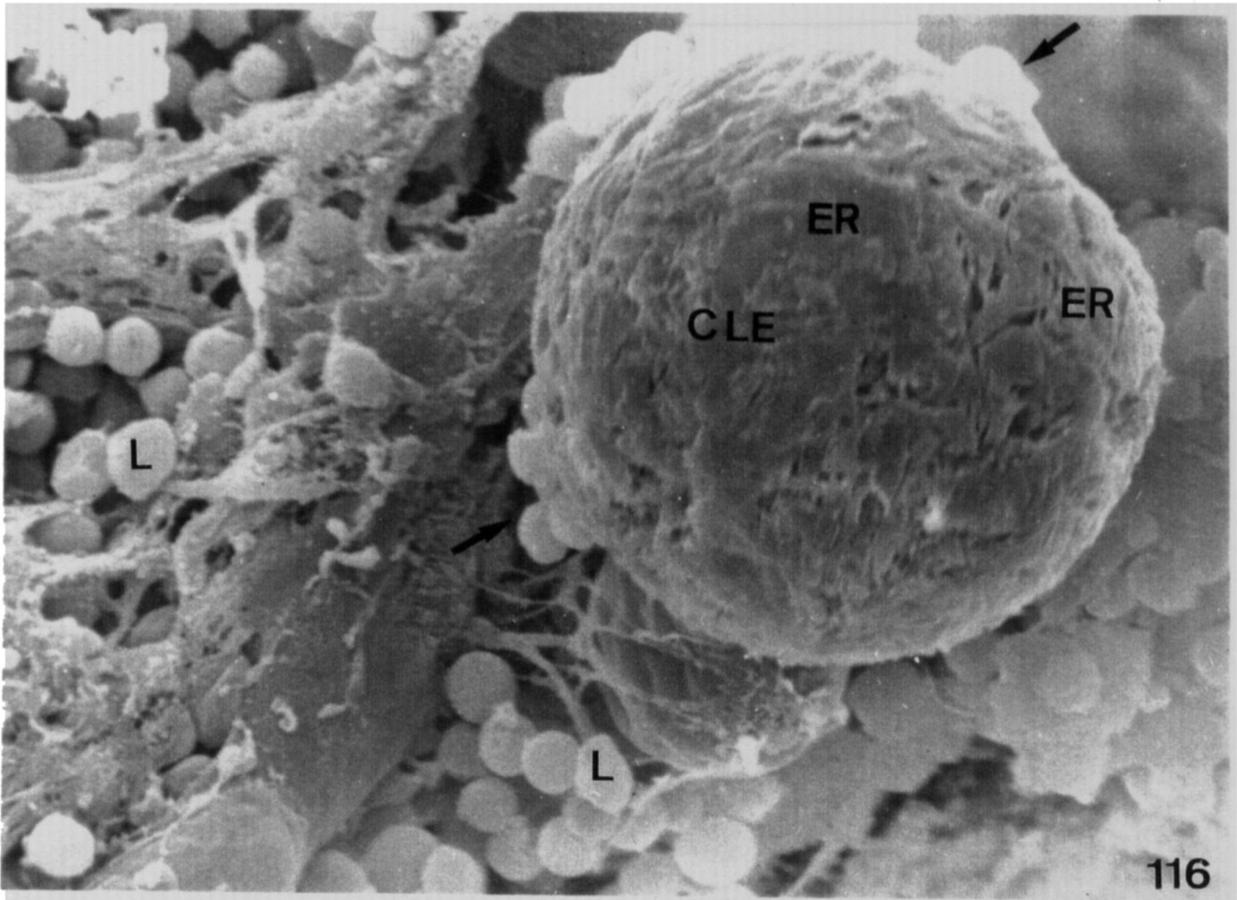


Lámina LVIII.

Figura 118. Vista superficial de la capa de CER limitantes entre la zona interna y la cápsula conectiva del timo de lubina. Se observa la relación (†) de las células epitelio reticulares (ER) del estroma con las CER limitantes (ERl). Linfocitos (L). x2.250.

Figura 119. Zona interna del timo de lubina. Se muestra la ramificación de una trabécula primaria (t1) en una trabécula secundaria (t2) y la densa trama epitelio reticular (†). Linfocitos (L). x1.350.

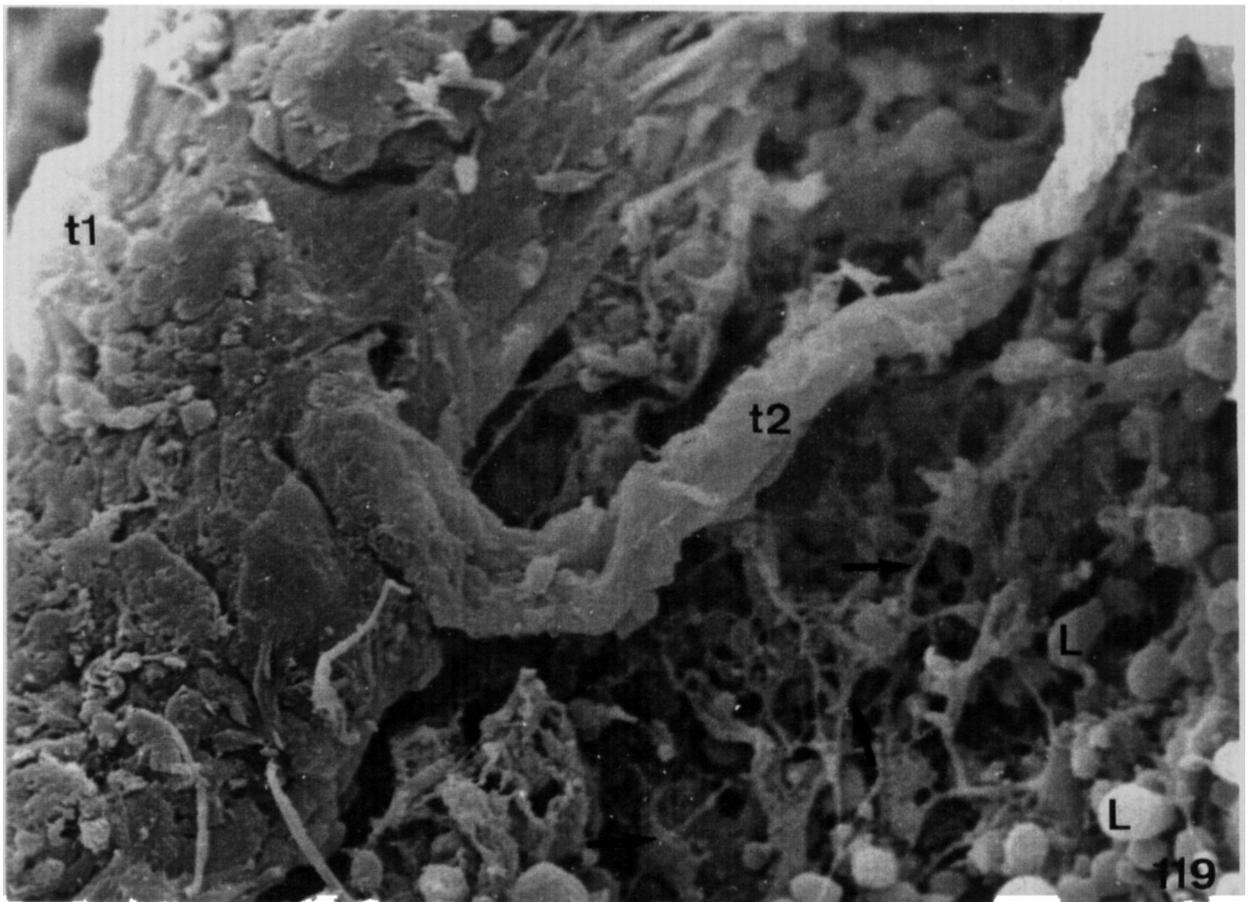
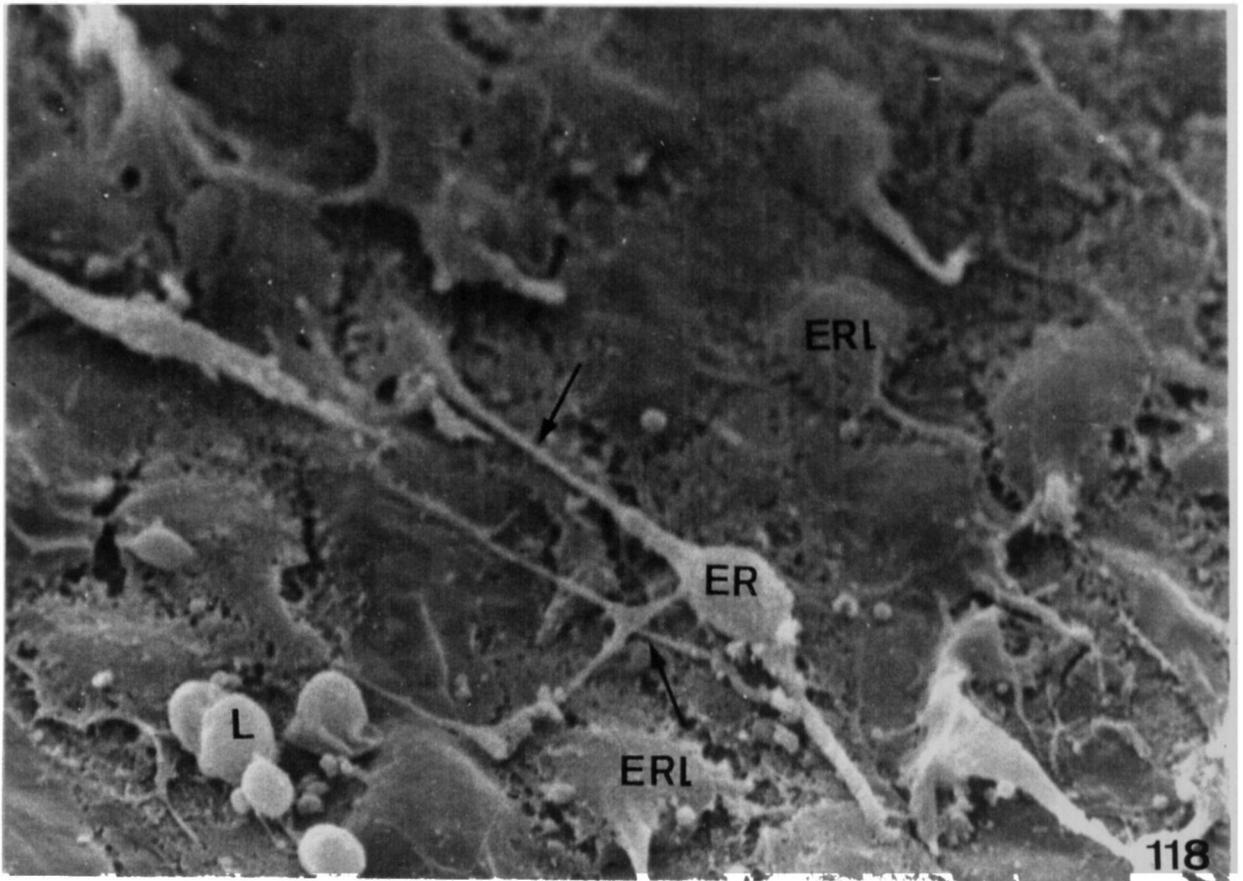


Lámina LIX.

Figura 120. Detalle de la zona interna del timo de lubina. Muestra la zona engrosada de una trabécula (t) donde se observa el tránsito de células (†) entre las CER limitantes (ERI). Apoptosis (ap). Linfocitos (L). x6.250.

Figura 121. Zona interna. Linfocitos con microvellosidades largas. x5.600.

Figura 122. Célula interdigitada (ID) de la zona interna del timo de lubina. Interdigitaciones (†). Linfocitos (L). x3.600.

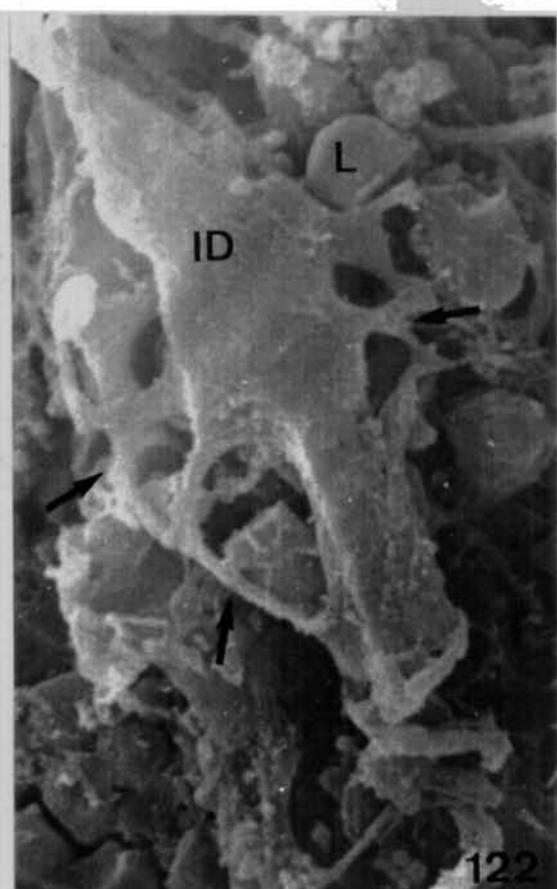
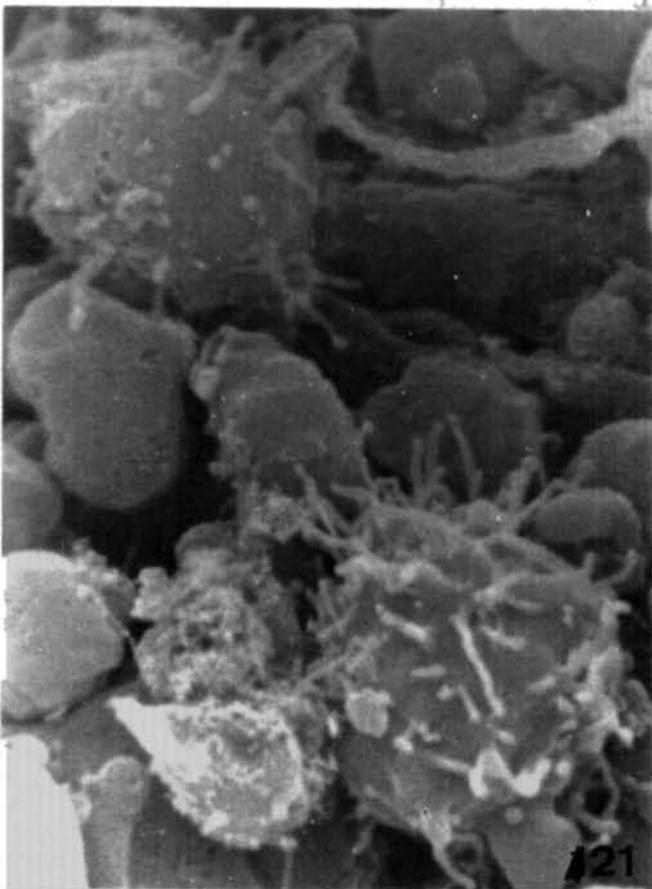
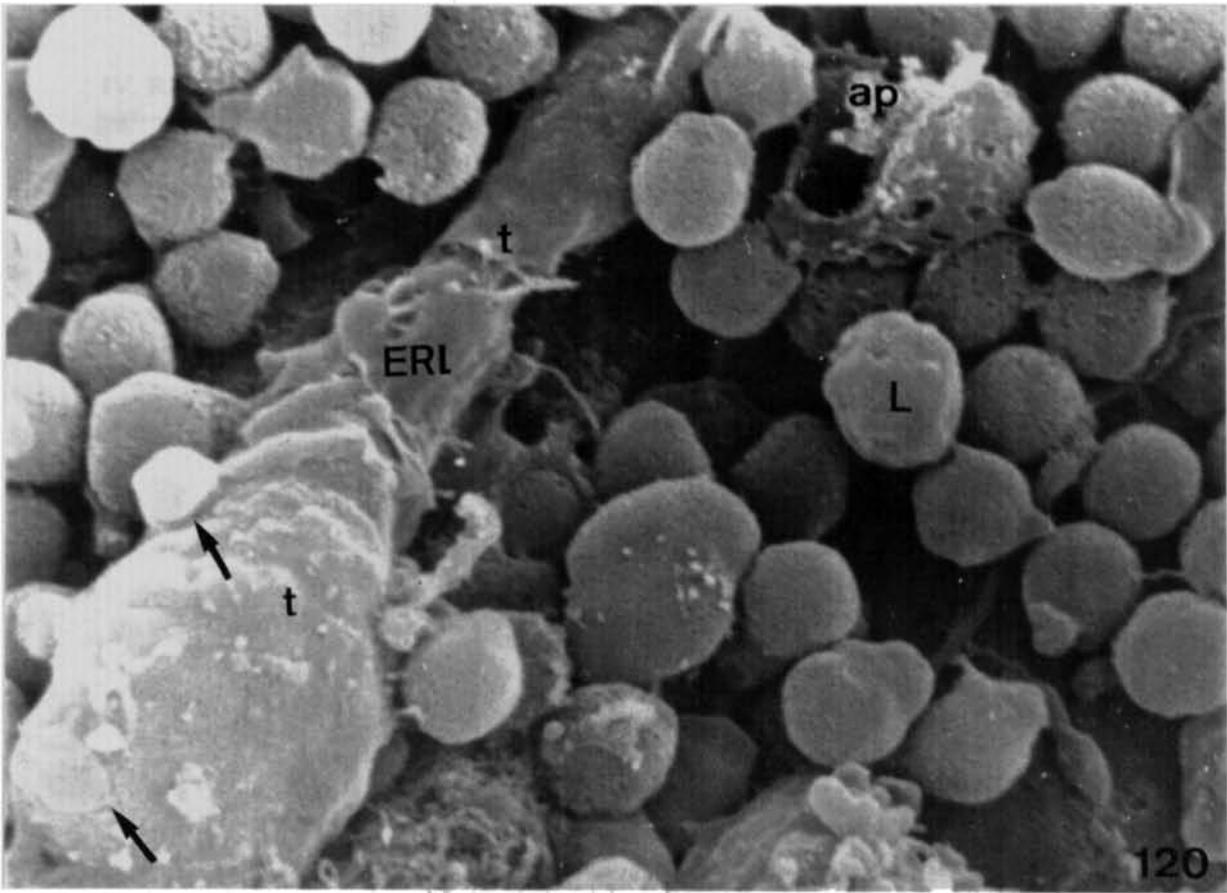
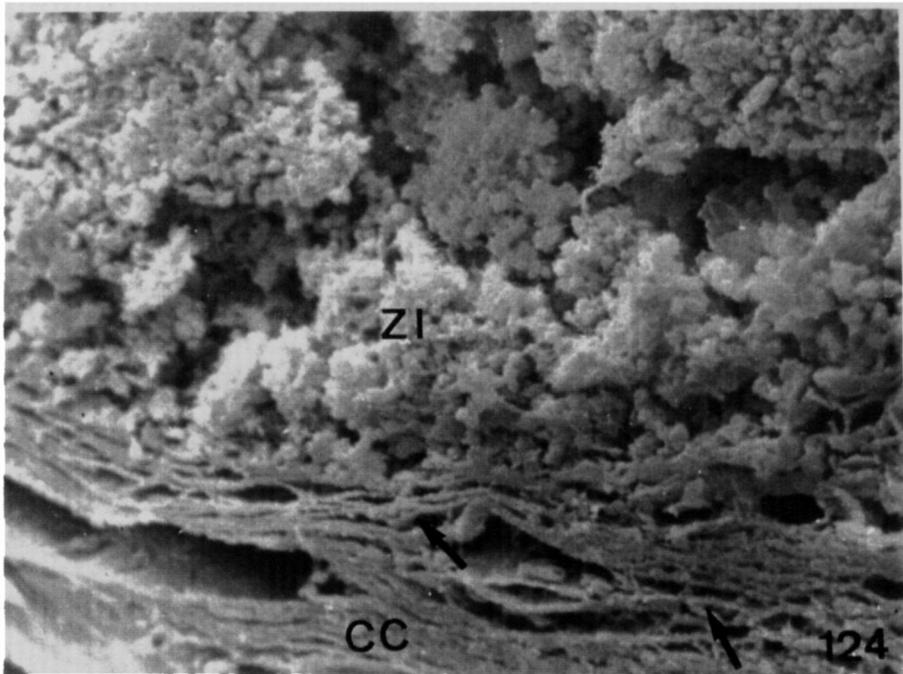
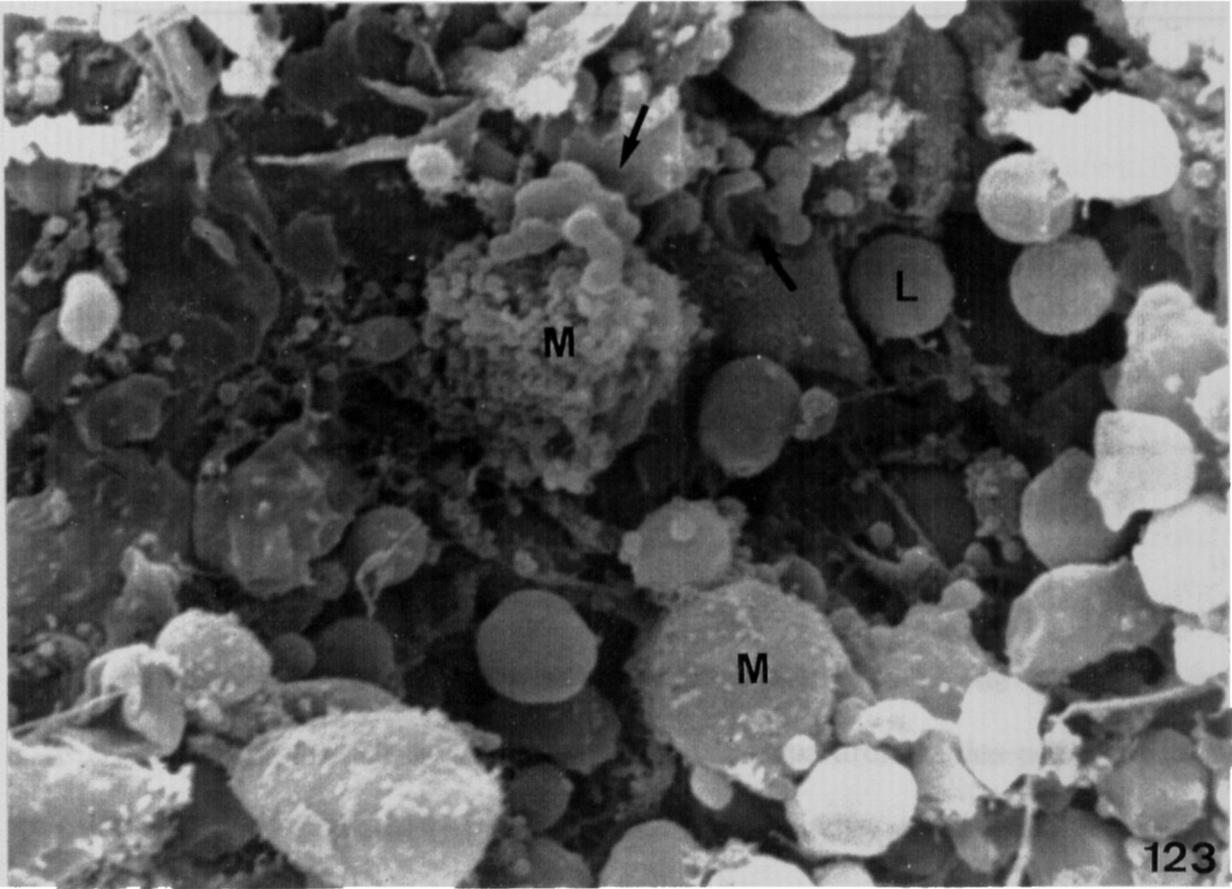


Lámina LX.

Figura 123. Zona interna del parénquima tímico. Obsérvense las estructuras aplanadas irregulares (†), posibles células necróticas, agrupadas en las proximidades de un macrófago (M). Linfocitos (L). x4.800.

Figura 124. Límite de la zona interna (ZI) con la cápsula conectiva (CC). Nótese la estructura laminar de los haces fibrilares (†). x700.



4. AISLAMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES DE TIMO.

Mediante el uso de gradientes continuos de densidad, las suspensiones celulares del timo de lubina se separaron en dos poblaciones de células (Bandas 1 y 2) que fueron estudiadas mediante ensayos de inmunofluorescencia para citometría de flujo y microscopía electrónica.

4.1. CITOMETRIA DE FLUJO.

La representación en un diagrama de dispersión de luz, simultáneamente, de las variables de dispersión frontal (FSC) y ortogonal (SSC) de luz nos permite discriminar los tipos celulares presentes en cada una de las bandas obtenidas en los gradientes de densidad y nos permite determinar el número y características de la población celular de cada muestra (Fig. 125).

En cada una de las bandas aisladas se observaron dos poblaciones celulares con características de FSC (tamaño celular) y SSC (complejidad intracelular) similares. Las poblaciones celulares de interés fueron señaladas mediante la fijación de ventanas (G1 y G2) (Fig. 125), para ser seguidamente analizadas.

La reactividad de las células frente al anticuerpo monoclonal (mAb) WSI-5 fue determinada por el análisis de la intensidad de inmunofluorescencia FITC para cada una de las ventanas mediante el uso simultáneo de una escala logarítmica de orden 4 en ambos ejes (Fig. 126). Observándose, que los valores de intensidad de fluorescencia de las muestras inmunofenotipadas fueron ligeramente más elevados que en los controles (Tabla VIII). En los histogramas de frecuencia de fluorescencia no aparecen picos positivos (células marcadas). Pensamos que en este caso estos máximos se encuentran solapados con los negativos (células no marcadas); por tanto, la realización de estos histogramas no permite dilucidar la presencia de células con inmunoglobulinas de superficie (sIg⁺). Este tipo de problemas eran de esperar ya que, como indican los datos bibliográficos, la presencia de células sIg⁺ en el timo de peces teleósteos es, como máximo de un 5% y generalmente, menor de un 2%. Además, este mismo problema se observa cuando no hay una alta especificidad del mAb con la población de células estudiada (Reacción cruzada en nuestro caso), cuando se trabaja con poblaciones celulares con escasa

presencia de lugares de unión para el mAb y que, por tanto, dan una baja intensidad de fluorescencia, cuando la avidez del mAb es baja, etc. Por tanto, para determinar si las diferencias observadas en la distribución de la fluorescencia entre las muestras control y las inmunofenotipadas, eran significativamente diferentes se recurrió al análisis estadístico. Al tratarse de muestras pequeñas se comprobó la "hipótesis de normalidad" de la población de origen de las muestras, resultando que la mayoría de los datos cumplían las condiciones de normalidad e igualdad de varianzas necesarias para poder aplicar métodos paramétricos de análisis estadístico a muestras pequeñas. Algunos de los datos, aunque muy próximos, no cumplen los requisitos anteriores; pero, al igual que la mayoría de datos biológicos, son el resultado de la suma de una multiplicidad de efectos independientes y, por tanto, tienden a distribuirse según leyes aproximadamente normales, lo que permite la aplicación de métodos paramétricos de análisis que no afectan demasiado a los resultados de las pruebas. Por otro lado, ante estos resultados, también fueron aplicados métodos no paramétricos que nos permiten realizar el mismo tipo de análisis estadístico sin exigir a las muestras el cumplimiento de unas condiciones o el seguimiento de una determinada ley de probabilidad de la que son independientes.

Según los resultados del análisis estadístico mostrados en la **tabla VIII**, se demuestra que la diferencia en la distribución de la intensidad de fluorescencia en las ventanas G1 de las bandas 1 y 2 es significativa, mientras

que en las ventanas G2 no lo es. Luego, la suma de los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos en las ventanas G1 de ambas bandas de las muestras inmunofenotipadas, previa sustracción de los valores de sus respectivos controles, nos indica que en la población de células aisladas del timo de lubina hay aproximadamente un 1% de células que expresan en su membrana plasmática sIg⁺, por ser inmunorreactivas frente a WSI-5.

Para estudiar la heterogeneidad de la población celular en cada una de las ventanas de ambas bandas se realizaron histogramas de frecuencia para las variables FSC y SSC (Fig. 127). Se observó una distribución de frecuencias diferente entre las poblaciones de las bandas 1 y 2 para dichos parámetros. En la banda 1 aparece una población celular (ventana G1) mayoritaria, con bajos valores de FSC y SSC que corresponden a una población celular de tamaño pequeño y escasa complejidad intracelular; mientras que en la banda 2, la población análoga a la anterior es menos abundante y se observa una segunda población de células (ventana G2) mucho más numerosa que en la banda 1 y relativamente abundante, cuyos valores de FSC y SSC implican un mayor tamaño celular y complejidad del citoplasma.

Para confirmar estos resultados se realizó el análisis bivariable de distribución de frecuencias de las variables FSC y SSC para el total de la población de células aisladas en cada banda (Fig. 128). Observándose que en la banda 1 aparece un único pico cuya base cubre un área pequeña y próxima al

nudo FSC/SSC, lo que indica la presencia de una población celular mayoritaria con bajos valores de FSC y SSC; mientras que en la banda 2 se diferencian claramente dos picos, uno similar al anterior y otro con una menor frecuencia de eventos pero con un área basal más amplia y con valores de FSC y SSC mayores, lo que representa una población celular de relativa abundancia caracterizada por un mayor tamaño celular y complejidad intracelular. Confirmándose así la heterogeneidad numérica y de características de FSC y SSC entre los tipos celulares aislados en ambas bandas, demostrados con los histogramas de frecuencia.

Tabla VIII. Resultados y tratamiento estadístico aplicado a los datos obtenidos mediante citometría de flujo.

	BANDA 1		BANDA 2	
	G1	G2	G1	G2
MEDIA (SE) CONTROL	0,93 (0,08)	1,43 (0,20)	0,37 (0,06)	0,51 (0,13)
MEDIA (SE) INMUNOFENOTIPADO	1,35 (0,12)	1,48 (0,30)	0,86 (0,24)	0,68 (0,19)
TEST T DE PAREJAS DE MUESTRAS ¹	p=0,10	p>0,80	p=0,03	p>0,30
PRUEBA T DE WILCOXON ²	p=0,05	p>0,90	p<0,02	p>0,30
PRUEBA T DE DOS MUESTRAS ¹	p=0,20	p>0,80	p<0,05	p=0,50
PRUEBA DE MANN-WHITNEY ²	p=0,05	p>0,90	p<0,02	p>0,70
ANALISIS DE LA VARIANCIAS ¹	p=0,05	p>0,90	p<0,02	p>0,60
PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS ²	p=0,05	p>0,80	p<0,02	p>0,6
SIGNIFICACION DE LOS TEST	SI	NO	SI	NO

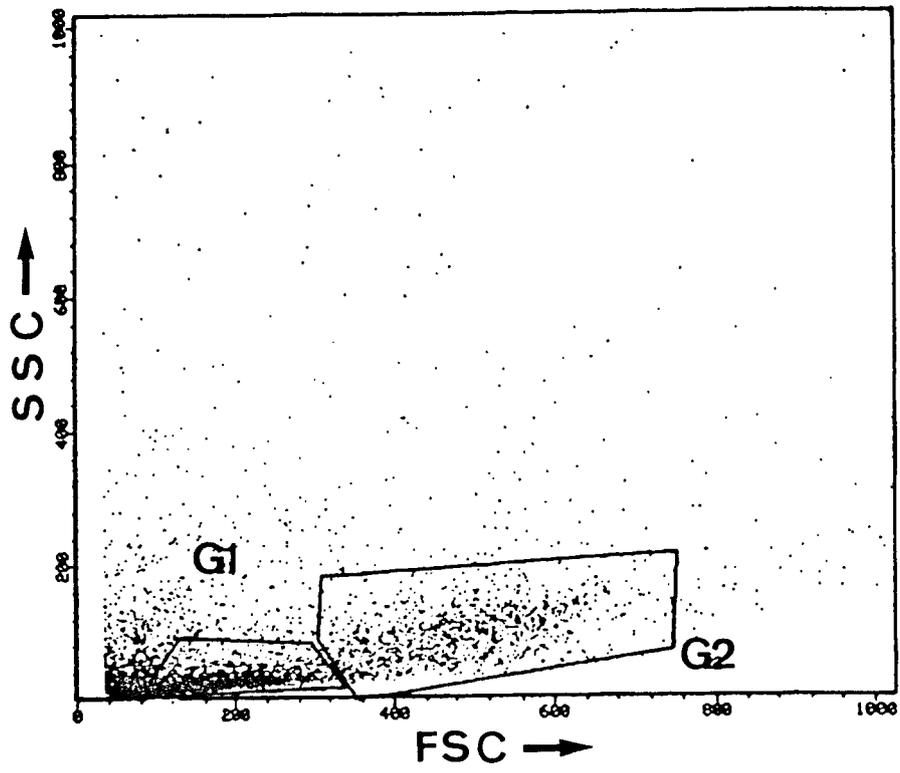
Leyenda: (p) Probabilidad de que exista diferencia entre las intensidades de fluorescencia.

- ⁽¹⁾ Pruebas estadísticas paramétricas.

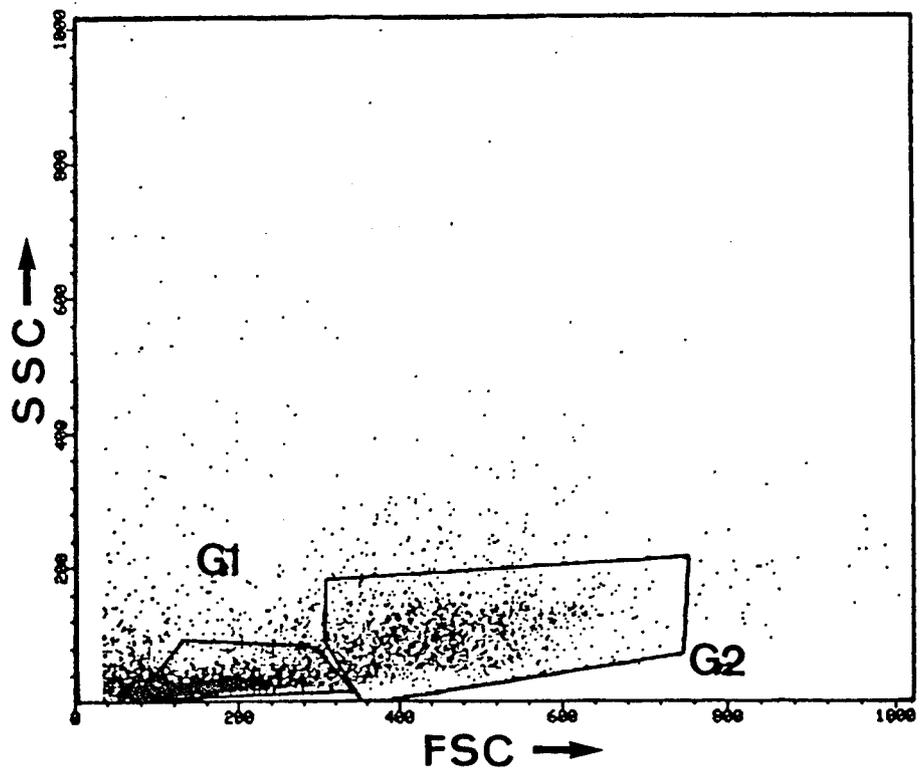
- ⁽²⁾ Pruebas estadísticas no paramétricas.

Lámina LXI.

Figura 125. Diagrama de dispersión de luz. Representación simultánea de las variables FSC y SSC. Obsérvese las ventanas G1 y G2. a) Banda 1. b) Banda 2.



125a



125b

Lámina LXII.

Figura 126. Diagrama de frecuencia de intensidad de inmunofluorescencia (FL1) de la banda 1. **a)** Ventana G1 control. **b)** Ventana G1 inmunofenotipado. **c)** Ventana G2 control. **d)** Ventana G2 inmunofenotipado. (Para la banda 2 los resultados son similares).

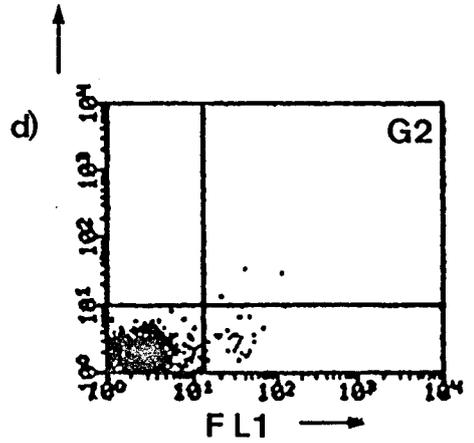
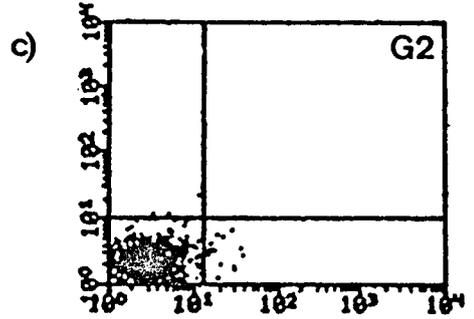
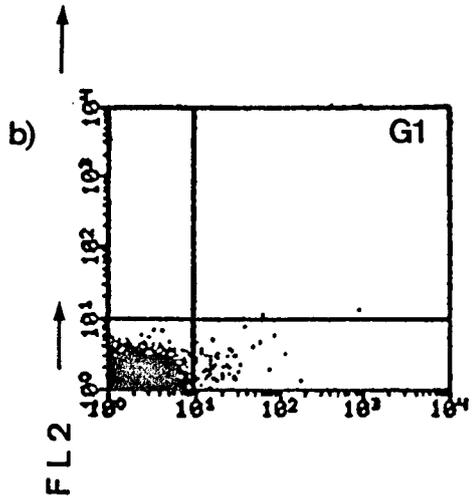
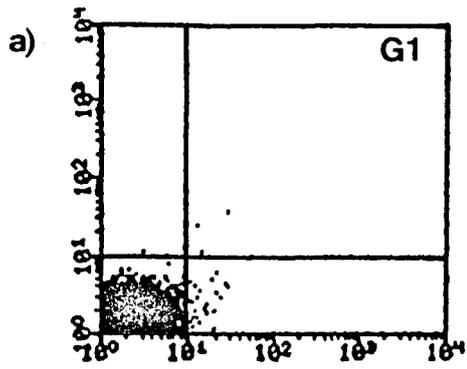


Lámina LXIII.

Figura 127. Histograma de distribución de frecuencias de las variables FSC y SSC para las ventanas G1 y G2. a) Banda 1. b) Banda 2.

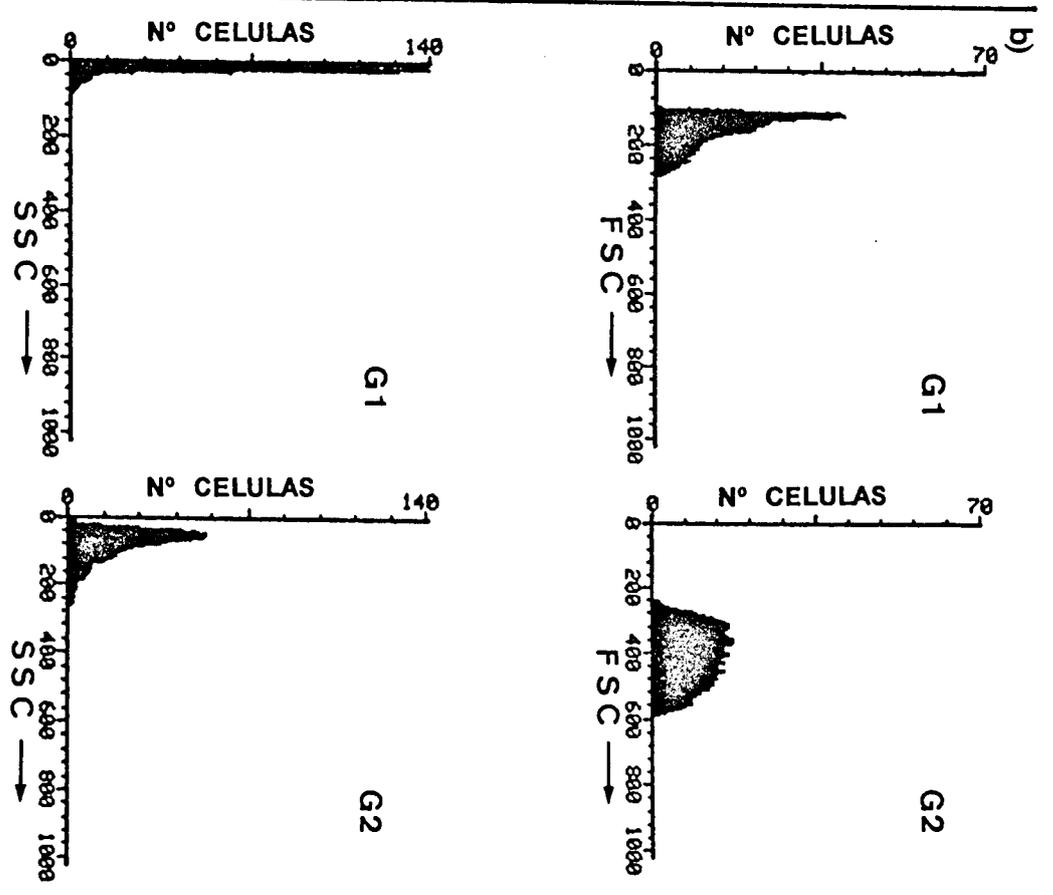
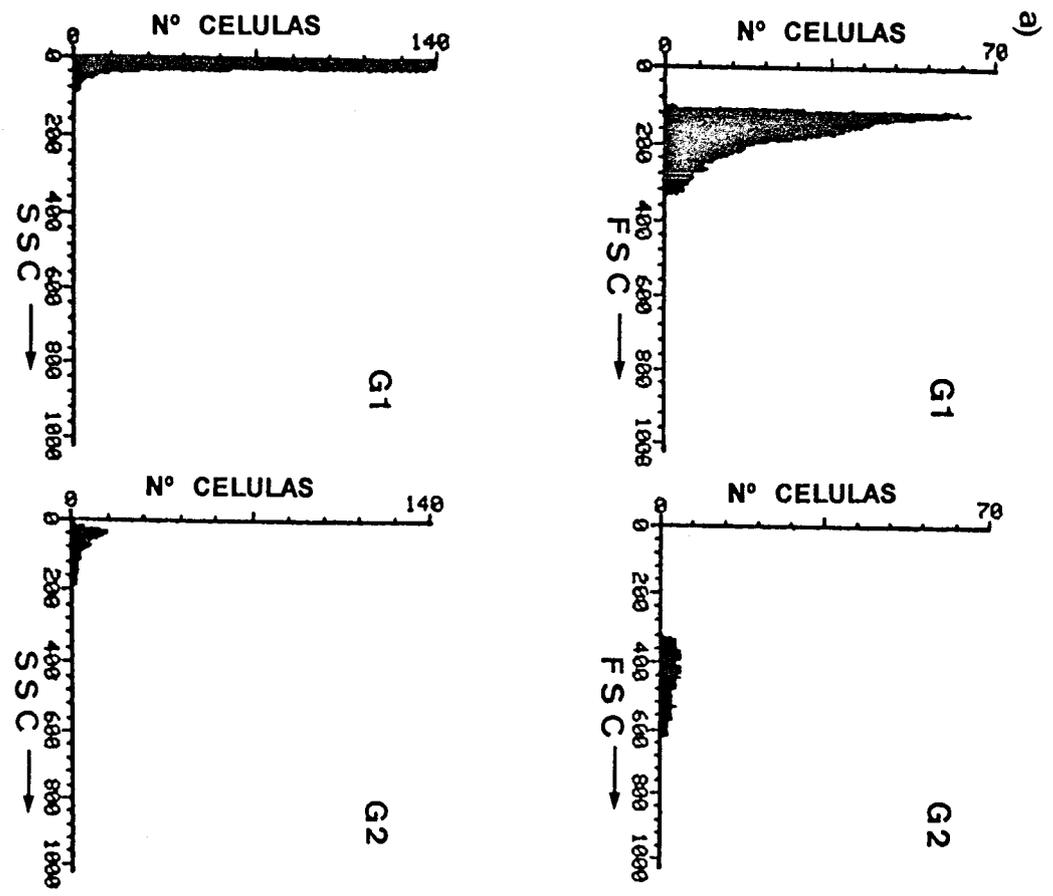
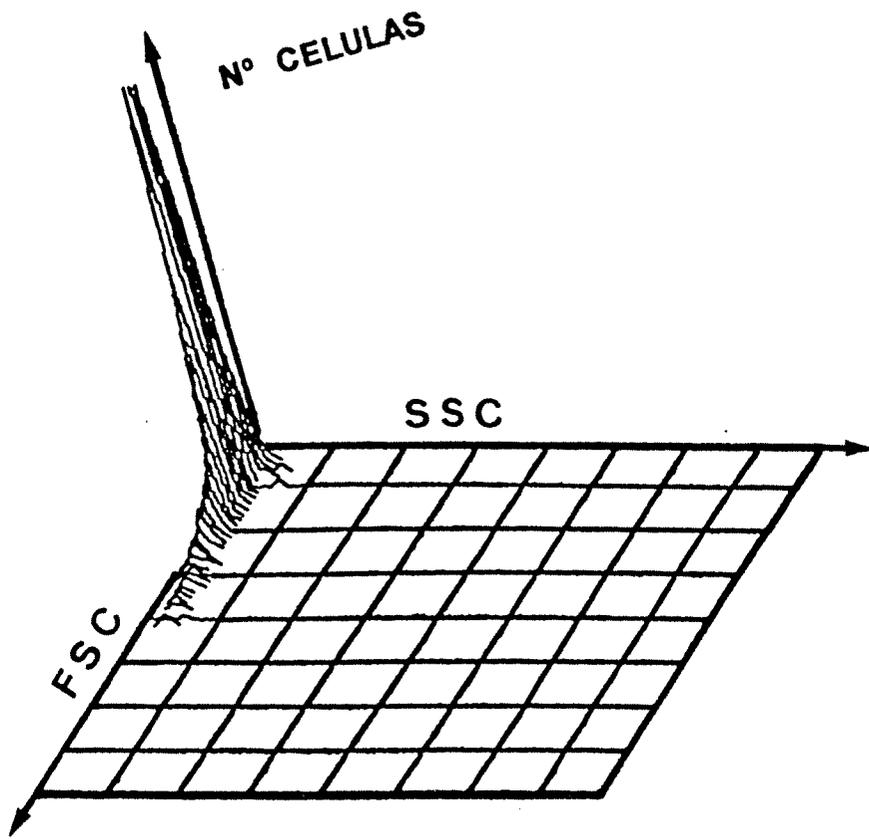


Lámina LXIV.

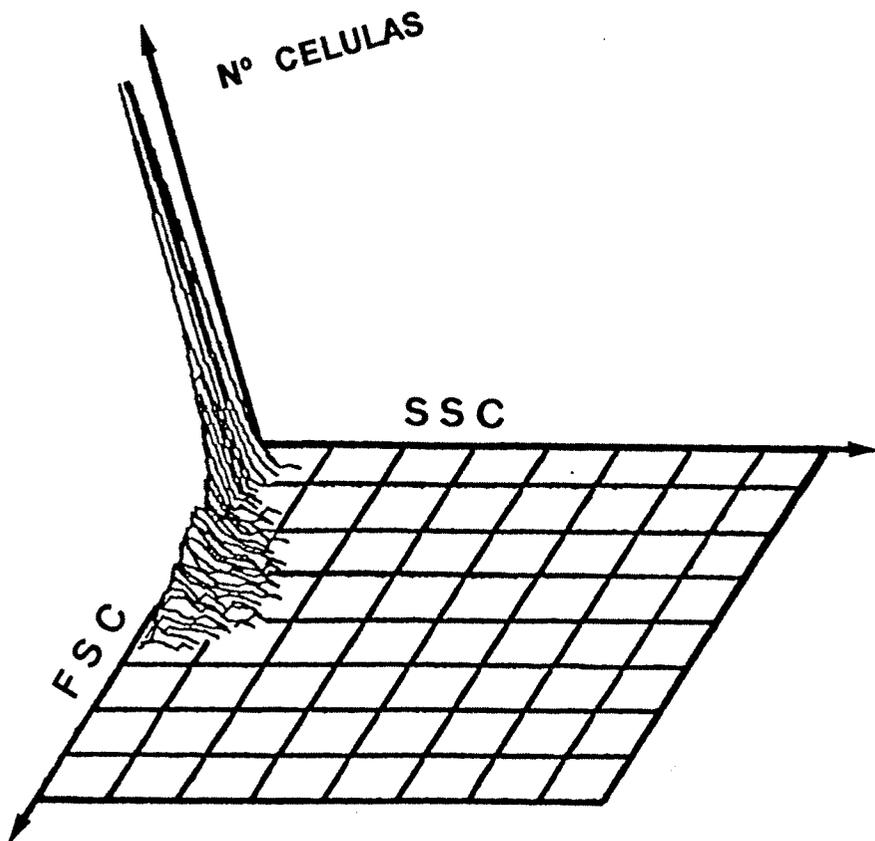
Figura 128. Histograma bivariable de distribución de frecuencia de FSC y SSC.

a) Banda 1. b) Banda 2.

a)



b)



4.2. ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Para estudiar si el proceso de aislamiento de las células influye en la señal de intensidad de inmunofluorescencia detectada mediante citometría de flujo y para identificar las diversas poblaciones celulares presentes en cada banda se realizaron, paralelamente a los estudios de citometría, ensayos microscópico electrónicos usando la técnica del oro coloidal para visualizar el inmunofenotipo de las células y para el estudio convencional de la heterogeneidad celular.

En la **tabla IX** representamos los tipos celulares presentes en cada una de las bandas indicando su abundancia relativa y la presencia o no de células inmunorreactivas frente a WSI-5.

El estudio inmunocitoquímico ultraestructural de las suspensiones celulares tratadas con oro coloidal muestra que parte de la población de linfocitos grandes de ambas bandas se marcaron en su superficie, observándose con frecuencia partículas de oro agrupadas en determinadas regiones de la membrana plasmática; mientras que en la población de linfocitos pequeños no se observó inmunorreacción (**Fig. 129**). Los melanomacrófagos y los macrófagos (**Fig. 130a**) sólo aparecen en la banda 2, y únicamente presentan sIg⁺ algunos de los macrófagos (**Fig. 130b**).

Los granulocitos, eosinófilos y heterófilos, presentes en ambas

bandas en una proporción similar, no presentan marcaje con oro coloidal.

Es de destacar que algunos de los tipos celulares aislados en las suspensiones muestran alteraciones morfológicas con respecto a las observaciones realizadas "in situ" en secciones histológicas, pero conservan rasgos ultraestructurales que permiten reconocer su naturaleza. Las células mioides son reconocibles al conservarse la ultraestructura de las triadas de retículo sarcoplasmático; aunque las miofibrillas, elemento característico de este tipo celular, no se observan y los miofilamentos aparecen dispersos de forma desordenada por todo el citoplasma. Las células mucosas reorganizan su citoplasma y muestran las organelas citoplasmáticas, incluso los gránulos de secreción, con mayor nitidez que en las secciones de tejido. Las células de cloruro se reconocen por la presencia de numerosas cisternas de REL anastomosadas entre sí y grandes mitocondrias.

Con este estudio se confirmaron los resultados de intensidad de fluorescencia y características de FSC y SSC obtenidas mediante citometría de flujo. Comprobándose que las células con valores de FSC y SSC bajos e inmunorreactividad positiva de ambas bandas se corresponden con linfocitos, que representan la principal población de células aisladas; mientras que la fracción minoritaria de células con valores elevados para ambos parámetros citométricos está formada por una población heterogénea de células con mayor tamaño y complejidad intracitoplasmática (células mucosas, células mioides, células de

cloruro, macrófagos y melanomacrófagos).

Tabla IX. Resumen de los datos obtenidos mediante el estudio inmunocitoquímico para microscopía electrónica.

	BANDA 1		BANDA 2	
	NUMERO	sig ⁺	NUMERO	sig ⁺
LINFOCITOS				
GRANDES	+++	++	++	+
PEQUEÑOS	+++	-	++	-
GRANULOCITOS				
EOSINOFILOS	+	-	+	-
HETEROFILOS	++	-	++	-
CELULAS MUCOSAS	+	-	++	-
CELULAS MIOIDES	+	-	++	-
CELULAS DE CLORURO	+	-	+	-
MACROFAGOS	-	-	++	+
MELANOMACROFAGOS	-	-	+	-

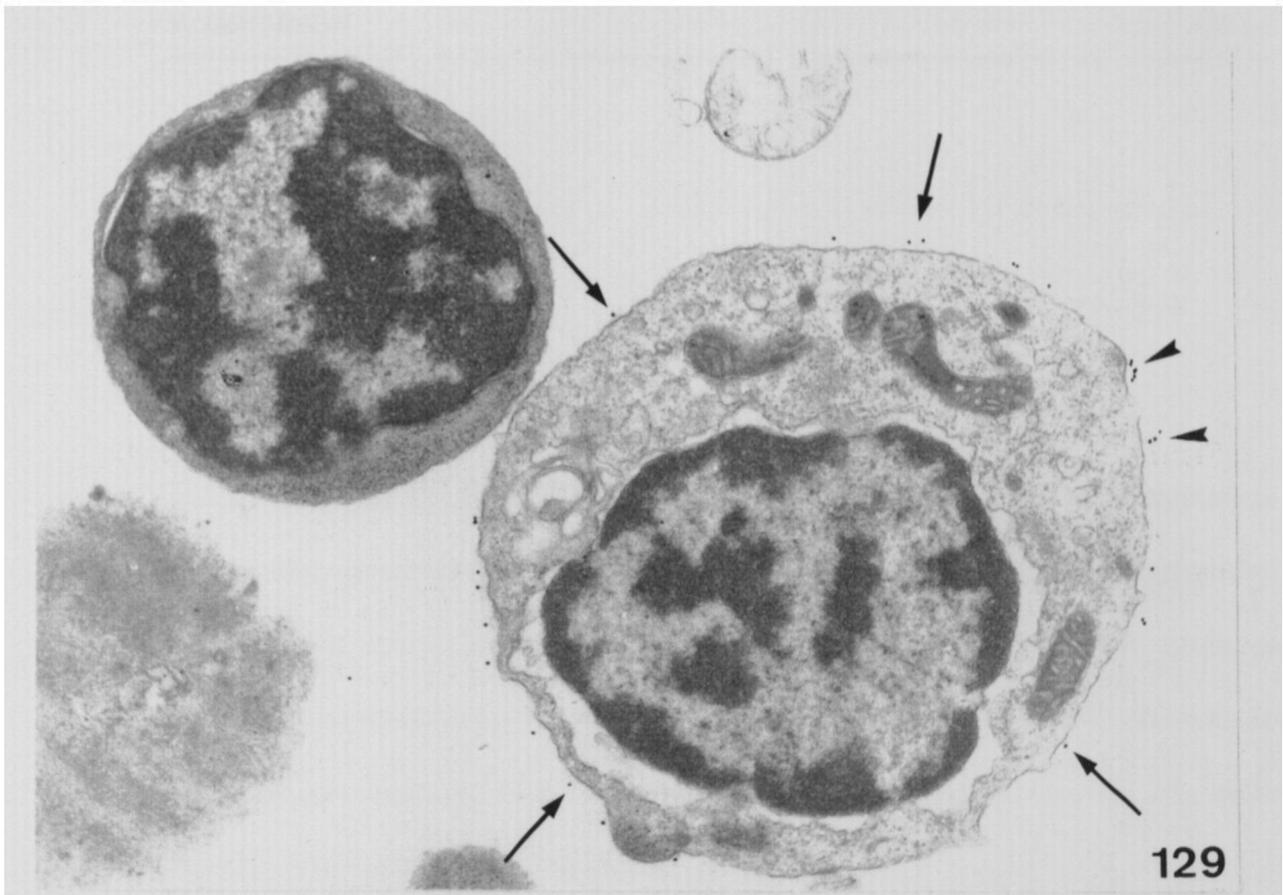
Leyenda: (-) Ausente, (+) Presente, (++) Moderado, (+++) Abundante.

Lámina LXV.

Figura 129. Linfocitos aislados (banda 1) mediante gradiente de densidad de suspensiones celulares de timo de lubina. Nótese la presencia de marcaje superficial (†) y partículas de oro agrupadas (▲) en la superficie del linfocito grande y la carencia de marcaje sobre el linfocito pequeño. x21.000.

Figura 130a. Macrófago aislado (banda 2) sin marcaje. x12.250.

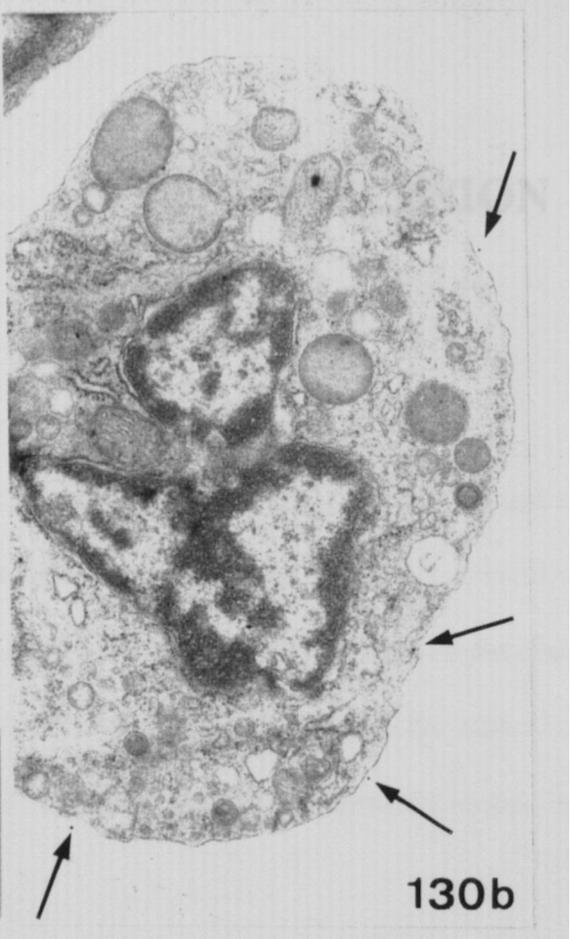
Figura 130b. Macrófago aislado (banda 2) mediante gradiente de densidad de suspensiones celulares de timo de lubina. Nótese la presencia de marcaje superficial (†) en la superficie x23.700.



129



130a



130b

V. DISCUSSION

Con el estudio bibliográfico ha quedado de manifiesto la existencia de notables diferencias interespecíficas y de discrepancia sobre la funcionalidad del timo de peces. Por lo que en este apartado, comentaremos nuestros resultados, comparándolos con las descripciones hechas por otros autores en peces y, en algunos casos, recurriremos a los datos obtenidos en otros vertebrados, cuando éstos no existan en peces.

1. ANATOMIA.

El timo de lubina (Dicentrarchus labrax L.), al igual que en todas las especies de peces teleósteos estudiadas, es un órgano linfoide, epitelio reticular, primario, par y bilateral, situado en la comisura dorsal de la cavidad branquial debajo del epitelio faríngeo de la cavidad branquial en estrecha asociación y continuidad con éste, al igual que en la mayoría de especies

estudiadas, Astyanax mexicanus (Hafter, 1952), Hyperprosopon argenteum (Engen, 1968), Clarias lazera (Rizkalla, 1969), Esox lucius (Mulcahy, 1970), Tilapia mossambica (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b), Salmo salar (Ellis, 1977), Salmo gairdneri (Grace y Manning, 1980; Tatner y Manning, 1982; Chilmonczyk, 1983, 1985; Tatner, 1985; Castillo y cols., 1987, 1990, 1991), Cyprinus carpio (Botham y Manning, 1981; Schneider, 1983), Rutilus rutilus (Zapata, 1981), Morone saxatilis (Groman, 1982), Cynolebias adloffi, Nothobranchius guentheri (Cooper y cols., 1983), Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), Zoarces viviparus (Bly, 1985), Ictalurus punctatus (Ellsaesser y cols., 1988), Dicentrarchus labrax, Harpagifer antarcticus, Pleuragramma antarcticum, Merlangius merlangus, Notothenia neglecta, Nototheniops larseni, Trematomus newnesi (O'Neill, 1989a, b, c), Paralichthys olivaceus, Pragus major, Seriola quinqueradiata (Chantanachookhin y cols., 1991), y a diferencia de Lophius piscatorius (Burne, 1927; Fänge y Pulsford, 1985) y L. budegassa (Picchio, 1933; Fänge y Pulsford, 1985), especies en las que el timo no presenta ningún contacto con el epitelio faríngeo y se localiza alejado de la cavidad branquial.

El timo de lubina está limitado internamente por una cápsula continua de tejido conectivo, similar a la descrita en teleósteos y en vertebrados superiores (Oláh y cols., 1975), que lo separa de los estratos musculares de la cabeza como en la mayoría de especies de teleósteos estudiadas (Hafter, 1952; Friedman, 1962; Engen, 1968; Rizkalla, 1969; Mulcahy, 1970; Sailendri y

Muthukkaruppan, 1975b; Ellis, 1977; Grace y Manning, 1980; Botham y Manning, 1981; Zapata, 1981; Groman, 1982; Tatner y Manning, 1982; Cooper y cols., 1983; Chilmoczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; Castillo y cols., 1987, 1990, 1991; O'Neill, 1989a, b, c; Chantanachookhin y cols., 1991), con excepción de Lophius piscatorius (Burne, 1927; Fänge y Pulsford, 1985) y L. budegassa (Picchio, 1933; Fänge y Pulsford, 1985) en los que la cápsula conectiva envuelve completamente al timo separándolo y aislándolo del epitelio faríngeo de la cavidad branquial.

A diferencia de lo descrito en otras especies de teleósteos (Hammar, 1909; Salkind, 1915; Hafter, 1952; Sailendri, 1973; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Gorgollón, 1983; Bly, 1985) y en anfibios (Cooper, 1967; Manning y Horton, 1969), nosotros no hemos observado ningún tipo de acumulación extratímica de tejido linfoide o estructura equivalente en las proximidades del timo de lubina; ya que las masas de tejido linfoide peritímico que aparecen aisladas en algunas secciones histológicas mantienen su relación con el timo, como se ha comprobado mediante el estudio de cortes seriados del órgano, al igual que podría suceder en algunas de las especies en las que se describe la presencia de acúmulos extratímicos (p. ej. Zoarces viviparus, Bly, 1985).

2. HISTOLOGIA.

La estructura histológica del timo de peces, donde aparece el órgano bien conformado, es, a grandes rasgos, similar a la existente en vertebrados superiores. Sin embargo, en peces, existen diferencias entre los distintos grupos. Así, en elasmobranchios (Good y Papermaster, 1964; Zapata, 1980) los límites entre las diferentes zonas son más patentes, mientras que en teleósteos no son tan manifiestos (Tamura y Honma, 1970; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Grizzley y Rogers, 1976; Ellis, 1977; Grace y Manning, 1980; Manning, 1981; Zapata, 1981; Savino y Santa-Rosa, 1982; Tatner y Manning, 1982; Cooper y cols., 1983; Chilmonczyk, 1983; Ellsaesser y cols., 1988).

A diferencia de O'Neill (1989b, c) que en lubina sólo indica la existencia de dos zonas tímicas (zonas externa e interna) en el parénquima, al igual que en Ictalurus punctatus (Grizzle y Rogers, 1976; Ellsaesser y cols., 1988), Rutilus rutilus (Zapata, 1981), Morone saxatilis (Groman, 1982), en el timo interno de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), Zoarces viviparus (Bly, 1985), Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1987), Harpagifer antarcticus (O'Neill, 1989a, c), Pleuragramma antarcticum (O'Neill, 1989b, c), Notothenia neglecta, Nototheniops larseni, Merlangius merlangus (O'Neill, 1989c), Pagrus major, Paralichthys olivaceus y Seriola quiqueradiata (Chantanachookhin y cols., 1991),

nosotros consideramos la existencia de tres zonas, cápsula epitelial, zona externa e interna, dentro del parénquima tímico de lubina como ha sido observado en otras especies de teleósteos, Salmo fario (Deansley, 1927), Anguilla vulgaris (von Hagen, 1936), Astyanax mexicanus (Hafter, 1952), Clarias lazera (Rizkalla, 1969), Tilapia mossambica (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b), Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983; 1985; Castillo y cols., 1990, 1991), timo externo de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), Rutilus rutilus (Zapata y Cooper, 1990). Mientras que otros autores no observan ninguna zonación en especies como Leucopsarion petersi (Tamura y Honma, 1974), Salmo salar (Ellis, 1977), Cynolebias adloffii, Nothobranchius guentheri (Cooper y cols., 1983), Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985) y Trematomus newnesi (O'Neill, 1989c) y en otros estudios se observa la existencia de hasta cuatro zonas diferenciables (Esox lucius; Mulcahy, 1970).

Ante esta disparidad de datos, Zapata (1981) sugiere que la existencia de varias zonas en el timo de teleósteos estaría relacionada con el tamaño del órgano. Sin embargo, recientemente, Castillo y cols. (1990) consideran que estas diferencias pueden ser atribuidas a adaptaciones específicas de especie, variaciones estacionales y/o relacionadas con la edad, estrés, nutrición, etc., que afectan profundamente a la morfología del timo de teleósteos (Tamura y cols., 1981; Nakanishi, 1986) y de otros vertebrados poiquiloterms (Zapata y Cooper, 1990) como está aceptado actualmente. A este respecto en

lubina, a lo largo del periodo anual que hemos estudiado, siempre observamos el mismo número de zonas tónicas, con un desarrollo similar en todas las estaciones.

La cápsula de tejido conectivo envuelve parcialmente al timo de lubina y emite trabéculas, de grosor y profundidad variables, hacia el interior del parénquima tónico al igual que en otras especies de teleósteos (Zapata, 1981; Groman, 1982; O'Neill, 1989a, b, c) y que nosotros clasificamos en primarias y secundarias al igual que en vertebrados superiores (Raviola, 1987). Las trabéculas primarias dan al timo de lubina un aspecto lobulado similar al de otros teleósteos (Burne, 1927; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Tamura y Honma, 1977; Botham y Manning, 1981; Chilmonczyk, 1983; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989b, c; Chantanachookhin y cols., 1991).

Las trabéculas conectivas primarias aparecen especialmente desarrolladas en la región superficial, entre la cápsula epitelial y la zona externa, formando una trama trabecular que septa parcialmente el parénquima entre ambas zonas, continuándose el parénquima tónico a través de sus huecos; esta estructura nos recuerda a la previamente descrita en el timo del holósteo Amia calva (Hill, 1933) y en el denominado timo interno por Gorgollón (1983) en Syciases sanguineus.

Según lo anteriormente expuesto y de acuerdo con Tatner y

Manning (1982) y O'Neill (1989b, c), consideramos que, sí el timo de peces es el precursor del timo de vertebrados superiores, es lógico que exista un proceso de internalización del órgano paralelamente a su evolución filogenética. Así, en teleósteos primitivos como Salmo gairdneri (Tatner y Manning, 1982), el timo permanece en posición superficial en total contacto con el epitelio. Mientras que según hemos observado en lubina hay conexiones zonales con el epitelio faríngeo, aunque O'Neill (1989b) indica la existencia de una separación completa en ejemplares adultos, y el resto del órgano aparece más internalizado y separado del epitelio por trabéculas conectivas de forma similar a lo descrito en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983); lo que podría representar filogenéticamente el comienzo de la separación del timo de su conexión superficial y finalmente en teleósteos superiores, Lophius sp. (Fänge y Pulsford, 1985), aparece totalmente aislado del epitelio faríngeo como en vertebrados superiores.

2.1. CAPSULA EPITELIAL.

Por su localización y estructura la cápsula epitelial del timo de lubina, constituida por el epitelio tímico y la zona subepitelial, es equivalente a

otras zonas tímicas similares previamente descritas como zona externa en Astyanax mexicanus (Hafter, 1952) y Tilapia mossambica (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b), cápsula epitelial (Chilmonczyk, 1983, 1985) o epitelio faríngeo y zona externa (Castillo y cols., 1990, 1991) en Salmo gairdneri y corteza externa en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983). Esta zona constituye un compartimiento que no tiene homólogo en el timo de vertebrados superiores, a diferencia de las otras zonas del timo de peces, y su significado es desconocido.

En lubina, al igual que en los teleósteos en los que el timo se localiza superficialmente, el epitelio tímico está constituido por una simple capa discontinua de células epiteliales entre las que se intercalan células caliciformes mucosecretoras, del mismo modo que han sido descritas en algunas especies de teleósteos (Engen, 1968; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Grace y Manning, 1980; Zapata, 1981; Tatner y Manning, 1982; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; Castillo y cols., 1990, 1991; Razquin y cols., 1990); y, ocasionalmente, aparecen células de cloruro como en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y macrófagos superficiales que también han sido observados formando parte del epitelio faríngeo que delimita el timo de Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990).

En lubina, al igual que en ejemplares juveniles de Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1985) y Harpagifer antarcticus (O'Neill, 1989a) la fragilidad de la barrera epitelial se puede ver incrementada por la presencia de poros epiteliales, que según O'Neill (1989b, c) permitirían el contacto directo entre el tejido

tímico y los antígenos presentes en el agua, sensibilizando directamente a los timocitos. En lubina observamos que estas estructuras se corresponden con la abertura externa de criptas epiteliales, que en su base presentan macrófagos, células mucosas y/o células de cloruro, similares a las del epitelio faríngeo de la cavidad branquial de teleósteos marinos.

En lubina, como en Salmo gairdneri (Manning, 1981; Tatner y Manning, 1982; Chilmonczyk, 1983, 1985), destaca la presencia de linfocitos cerca de la superficie tímica y separados del medio externo sólo por las células epiteliales. Aunque no se observan linfoblastos como en Astyanax mexicanus (Hafter, 1952), en lubina aparecen células linfoides en apoptosis, fenómeno que sugiere la existencia de procesos de selección negativa durante la diferenciación intratímica de acuerdo con lo descrito en mamíferos (Kendall, 1991). El estroma de esta región presenta CER claras y oscuras idénticas a las existentes en otras zonas del órgano; sin embargo, en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y en Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983, 1985; Castillo y cols., 1990, 1991), sólo se describe un tipo de CER e incluso Castillo y cols. (1990, 1991) observan un tipo de CER exclusivo de esta zona. Las células mucosecretoras aparecen distribuidas por todo el parénquima de esta zona del mismo modo que en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990). En lubina no sólo aparecen células mucosecretoras diferenciadas sino que también se observan todos los estadios de formación, que no han sido previamente

descritos en otros teleósteos. A diferencia de lo descrito en las especies de teleósteos estudiadas, en lubina, además de los macrófagos intraepiteliales, hay macrófagos libres estrechamente relacionados con los linfocitos en la zona subepitelial.

A diferencia de otras especies no se observan estructuras quísticas (Gorgollón, 1983; Castillo y cols., 1990) o corpúsculos de Hassall (Gorgollón, 1983) en la región subepitelial del timo de lubina.

A diferencia del resto de grupos de vertebrados superiores, elasmobranquios y algunos condrósteos, según se ha discutido anteriormente, el timo de teleósteos mantiene, salvo excepciones (Fänge y Pulsford, 1985), relación directa con el epitelio faríngeo de la cavidad branquial. Lo que implica la posibilidad de intercambio antigénico entre el ambiente externo y el tejido linfoide de acuerdo con lo descrito por Manning (1981), Chilmonczyk (1983, 1985) y Castillo y cols. (1990); para lo que el epitelio podría sufrir, incluso, cambios de permeabilidad, según sugieren Tatner y Manning (1982).

La posibilidad de un acceso fácil de los antígenos al timo de teleósteos nos sugiere la existencia de procesos antígeno dependientes de acuerdo con otros autores (Yoffey, 1981; Tatner y Manning, 1982; Rowley y cols., 1988; O'Neill, 1989c). Esta hipótesis ya fue propuesta por Beard (1894) y Emmrich y cols. (1975), quienes atribuyen al timo de teleósteos mecanismos de defensa activa contra infecciones orales y de la región faríngea, considerando

que persisten las funciones de un órgano linfoide secundario, existentes en el "prototimo", de grupos filogenéticamente inferiores como los agnatos (Manning y Turner, 1976; Fujii, 1982; Page y Rowley, 1982; Ardavin y cols., 1984; Ardavin y Zapata, 1988). A este respecto, Tatner y Manning (1982) indican que es posible que la vida acuática imponga ciertas características funcionales al timo, como la defensa activa, y quizás hasta emerger a la tierra no restrinja sus funciones a la diferenciación de células T.

Sugerimos que los macrófagos superficiales y libres en esta zona subepitelial tienen un papel importante en la captación y procesamiento de antígenos, como ocurre en vertebrados superiores y ha sido demostrado también para macrófagos de peces (Clem y cols., 1985; Miller y cols., 1985). A este respecto es de destacar la presencia de una subpoblación de macrófagos inmunorreactivos para sIg en suspensiones celulares de timo de lubina, cuyo significado funcional en el timo, y en concreto en esta zona, estaría en concordancia con los resultados obtenidos recientemente en macrófagos intestinales de Cyprinus carpio por Rombout y cols. (1993), quienes indican que estas células tienen capacidad de unir Ig y participar en los procesos de presentación antigénica, jugando un papel importante en la respuesta inmunitaria local.

2.2. ZONA EXTERNA.

La zona externa del timo de lubina aparece densamente poblada a diferencia de la región subepitelial de la cápsula epitelial y de la zona interna. Estructuralmente puede ser considerada análoga a la corteza tímica de vertebrados superiores, al igual que en otras especies de teleósteos, donde recibe distintas denominaciones. Así, ha sido denominada zona media en Astyanax mexicanus (Hafter, 1952) y Tilapia mossambica (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b), zona cortical o corteza en Cyprinus carpio (Botham y Manning, 1981), Rutilus rutilus (Zapata, 1981), Morone saxatilis (Groman, 1982), Sebastiscus marmoratus (Nakanishi, 1986) e Ictalurus punctatus (Ellsaesser y cols, 1988), zona externa en Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983, 1985; Castillo y cols., 1987; Razquin y cols., 1990), Dicentrarchus labrax, Harpagifer antarcticus, Pleuragramma antarcticum, Merlangius merlangus, Notothenia merlangus, Nototheniops larseni (O'Neill, 1989a, b, c), Paralichthys olivaceus, Pragus major y Seriola quinqueradiata (Chantanachookhin y cols., 1991), corteza profunda y zona central o interna respectivamente en el timo externo e interno de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), zona lateral en Zoarces viviparus (Bly, 1985), zona densa en Oryzias latipes (Ghoneum y cols., 1986) y zona interna en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990, 1991). Se dispone a modo de banda entre la

cápsula epitelial y la zona interna, a la que no envuelve completamente, recordándonos la disposición de zonas equivalentes previamente descritas en varias especies de teleósteos (Hafter, 1952; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Chilmonczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983; Castillo y cols., 1990, 1991; Zapata y Cooper, 1990).

En lubina, como en las especies de teleósteos que presentan una zona análoga a ésta, no existe una clara separación entre zonas y el parénquima tímico se modifica progresivamente para adquirir las estructuras histológicas propias de cada zona. Entre la cápsula epitelial y la zona externa del timo de lubina observamos una amplia red de trabéculas paralela a la superficie tímica que septa parcialmente al parénquima en la intersección de ambas zonas, quedando amplios espacios en la trama trabecular por donde se continua el tejido linfoepitelial. Esta red trabecular es equivalente a las ramificaciones trabeculares observadas a este nivel en los teleósteos Sycias sanguineus (Gorgollón, 1983) y Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990) y en el holósteo Amia calva (Hill, 1935).

El citorretículo de la zona externa de lubina presenta características similares al de la cápsula epitelial y, sin embargo, está menos desarrollado que en la zona interna, como ocurre en otras especies de teleósteos (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Chilmonczyk, 1983, 1985; Bly, 1985). En la zona externa el estroma epitelio reticular presenta notables diferencias

interespecíficas; así en Rutilus rutilus (Zapata, 1981) y en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) sólo existe un tipo de CER. En Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985), donde no se distinguen zonas, han sido descritos dos tipos y en Salmo gairdneri estudios ultraestructurales indican la existencia de un solo tipo (Chilmonczyk, 1983) mientras que estudios histoenzimáticos y ultraestructurales indican la existencia de cuatro tipos diferentes (Castillo y cols., 1990, 1991), número similar al encontrado en timo humano (van de Wijngaert y cols., 1984). En el timo de lubina encontramos cuatro tipos de CER, como son: CER limitantes, claras, intermedias y oscuras.

Las CER limitantes del timo de lubina tienen características morfológicas semejantes a las descritas en algunos teleósteos (Chilmonczyk, 1983; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; Castillo y cols., 1990, 1991) y en vertebrados superiores (Duijvestijn y Hoefsmit, 1981; Kendall, 1981b; Singh, 1981; van de Wijngaert y cols., 1984). Estas células constituyen una población especializada, por presentar capacidad secretora, relacionada con la formación de la membrana basal sobre la que se disponen, de acuerdo con lo observado en timo humano (van de Wijngaert y cols., 1984; von Gaudecker y cols., 1986) y en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990).

Además, las CER limitantes forman parte de la barrera hematotímica descrita en teleósteos (Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983) y en vertebrados superiores, aunque la existencia de ésta y su significado funcional

es controvertido. En este sentido, hemos de indicar la presencia, en lubina, de células sanguíneas en tránsito a través de espacios entre las CER limitantes a nivel de las trabéculas y de la cápsula conectiva, al igual que han sido observadas en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y en estadios tempranos de desarrollo de Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1991) y en roedores (Duijvestijn y Hoefsmit, 1981). Estudios en mamíferos atribuyen a este tipo celular, como constituyente de la barrera hematotímica, un cierto papel en la regulación de la entrada al parénquima tímico de diferentes células y sustancias (Sainte-Marie y cols., 1986).

En la zona externa del timo de lubina el componente predominante del estroma son las CER claras, que presentan unas características morfológicas similares a las CER estrelladas claras y CER hipertróficas de Lophius piscatorius (Fänge y pulsford, 1985), a las CER claras y CER subcapsulares de Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990, 1991) y a las CER claras descritas en vertebrados superiores. Estas células son consideradas como candidatas para la síntesis de factores tímicos (Duijvestijn y Hoefsmit, 1981; Kendall, 1981b; Singh, 1981; van de Wijngaert y cols., 1984) y que en D. labrax y Cyprinus carpio son inmunorreactivas a timulina o factor tímico sérico (FTS) (Frohely y Deschaux, 1986). A este respecto las CER claras de lubina muestran rasgos ultraestructurales de actividad sintetizadora, como un gran núcleo eucromatínico con un prominente nucléolo y cisternas de RE dilatadas, al igual

que las CER claras de Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990).

En algunos casos las CER claras de lubina presentan cavidades quísticas en su citoplasma lo que estaría en concordancia con lo observado en Salmo gairdneri por Castillo y cols. (1990), quienes demuestran que el patrón histoenzimático de las CER claras es el mismo que en las CER quísticas. Además, las CER claras de lubina con quistes intracelulares son semejantes a las CER hipertróficas de Lophius piscatorius donde estas células están relacionadas con la formación de quistes intercelulares (Fänge y Pulsford, 1985), estructuras que no han sido observadas en el timo de lubina.

Aunque el significado funcional de los quistes tímicos es desconocido, las CER claras quísticas podrían tener una función secretora equivalente a la de los quistes tímicos descritos en algunas especies de teleósteos (Zapata, 1981; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985) y en vertebrados superiores (Kendall, 1980, 1981b; Duijvestijn y Hoefsmit, 1981).

Las CER claras de lubina están estrechamente relacionadas con los linfocitos en esta zona, del mismo modo que las CER subcapsulares de Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1991) y las CER claras de timo humano (van de Wijngaert y cols., 1984). Estas interacciones celulares podrían tener un significado funcional similar al propuesto para las CER de la corteza tímica de vertebrados superiores (Ritter y cols., 1985; Kampinga y cols., 1987) donde se las considera como una población de células específica que influyen en la

maduración de los timocitos (Zinkernagel y cols., 1978).

En el timo de lubina hay un tipo de CER, denominadas CER intermedias, que no ha sido descrito previamente en teleósteos. Estas células forman parte del estroma de la zona externa profunda y se encuentran generalmente unidas entre sí delimitando estructuras similares a nidos o islotes que rodean a pequeños grupos de linfocitos, que pueden migrar a través de estas estructuras como observamos con microscopía electrónica de barrido y, ocasionalmente, muestran típicas imágenes de emperipolesis de linfocitos. En timo de mamíferos, también se han descrito CER intermedias (van de Wijngaert y cols., 1983, 1984; van Ewijk, 1988; Dipasquale y Tridente, 1991) con la misma localización, características morfológicas y en estrecha asociación con linfocitos como en lubina.

Las CER intermedias del timo humano se correlacionan con las células "nurse" obtenidas en las suspensiones celulares del mismo órgano (van de Wijngaert y cols., 1983; 1984; Dipasquale y Tridente, 1991), aunque Toussaint-Demylle y cols. (1990) concluyen que las células tímicas "nurse" observadas "in vitro" son artefactos. La localización próxima a la zona interna, en concordancia con los argumentos que indican que estas células no intervienen en los primeros pasos de diferenciación de los protimocitos en mamíferos (van Ewijk, 1988), y las semejanzas morfofuncionales con las células "nurse" del timo de mamíferos nos permiten sugerir una funcionalidad semejante para las células intermedias

del timo de lubina.

Morfológicamente, las CER oscuras de la zona externa del timo de lubina son similares a sus homólogas de Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990, 1991) y de vertebrados superiores (Duijvestijn y Hoefsmit, 1981; Kendall, 1981b; Singh, 1981; van de Wijngaert y cols., 1984) y se encuentran preferentemente en la región adyacente a la zona interna del mismo modo que sus homónimas en timo humano y de rata. Sin embargo, en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990, 1991) están regularmente distribuidas por toda la zona externa siendo el tipo predominante.

Las características morfológicas de las CER oscuras nos indican baja actividad, y posible degeneración, de la célula por el incremento de la heterocromatina, la presencia de lisosomas, autofagosomas y un aparato de Golgi y un RER poco desarrollados. Las CER oscuras degeneradas podrían ser fagocitadas por macrófagos como describen van de Wijngaert y cols. (1984) en el timo humano.

La presencia en el timo de lubina de varios tipos de CER sugiere la existencia de un proceso de diferenciación, ya que las CER claras muestran unas características morfológicas de gran actividad en contraste con las CER oscuras y con respecto a la morfología de las CER intermedias también se han observado formas transicionales con los otros tipos, lo que sugiere un proceso progresivo de transformación de CER del tipo claro al oscuro, similar al

propuesto en vertebrados superiores (van de Wijngaert y cols., 1984); en este sentido, van Ewijk (1988) indica la existencia de evidencias en contra de la naturaleza estática del estroma epitelio reticular tímico.

El parénquima de la zona externa del timo de lubina se caracteriza por un predominio de las células linfoides, principalmente linfocitos pequeños, que aparecen empaquetadas en los intersticios de las CER y le dan las características tintoriales propias de la zona al igual que en otros teleósteos (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Chilmonczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; O'Neill, 1989a, b, c; Castillo y cols., 1990; Chantanachookhin y cols., 1991). También observamos linfocitos de tamaño intermedio, como en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990), y linfoblastos, al igual que en Morone saxatilis (Groman, 1982) y Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983). En lubina los linfoblastos se localizan próximos al límite con la cápsula epitelial, a diferencia de Syciases sanguineus donde aparecen cerca del límite con la zona interna (Gorgollón, 1983) y de Morone saxatilis donde están distribuidos regularmente por todo el parénquima de esta zona (Groman, 1982). Las mitosis son escasas como en otros teleósteos (Chilmonczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983).

Según nuestras observaciones y las realizadas con microscopía óptica por O'Neill (1989b, c), los macrófagos observados en la zona externa, así como en la zona interna, de lubina no presentan diferencias de localización ni

morfológicas con los descritos en otras especies de teleósteos (Rizkalla, 1969; Zapata, 1981; Groman, 1982; Gorgollón, 1983; Bly, 1985; O'Neill, 1989b, c; Castillo y cols., 1990; Razquin y cols., 1990) ni tampoco con otros vertebrados (Frazier, 1973; Zapata, 1980; Duijvestijn y Hoefsmit, 1981; Zapata y Cooper, 1990), observándose sólo variaciones interespecíficas en cuanto al número relativo de ellos.

Los macrófagos en el timo de lubina tienen una gran actividad fagocitaria de distintos tipos celulares y en especial de timocitos como ha sido señalado en otras especies de teleósteos (Castillo y cols., 1990; Zapata y Cooper, 1990) y mamíferos (Duijvestijn y Hoefsmit, 1981). Con cierta frecuencia hemos observado en el timo de lubina macrófagos en estrecha asociación con linfocitos, de modo similar se han descrito estas asociaciones en el teleósteo Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985), en el elasmobranquio Scyliorhinus canicula (Pulsford y cols., 1984) y en mamíferos (Lipsky y Rosenthal, 1973; Oláh y cols., 1975). Así consideramos que estas células forman parte del microambiente tímico al igual que en mamíferos (Duijvestijn y cols., 1983; Sminia y cols., 1986) y que probablemente, a través de la fagocitosis, procesado y presentación de antígenos, esten envueltas en la diferenciación de las células T como se ha indicado en mamíferos (Rosenthal y cols., 1975; Longo y Swartz, 1980; Born y Wekerle, 1982).

Nuestras observaciones corroboran la presencia de

melanomacrófagos aislados y formando agregados como fue indicado por O'Neill (1989b, c) en el timo de lubina. Sin embargo, en Merlangius merlangus (O'Neill, 1989c) y Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990) sólo aparecen aislados y en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) aparecen formando centros en el tejido conectivo peritímico, por lo que el sistema monocítico-fagocitario parece estar bien desarrollado en lubina. Los agregados melanomacrófágicos del timo de lubina son similares a los centros melanomacrófágicos descritos en el bazo (Quesada y cols., 1990) y en riñón cefálico (Meseguer y cols., 1991) de esta misma especie y a los descritos en otros órganos hematopoyéticos de otros teleósteos (Roberts, 1975; Ellis, 1980; Lamers, 1985; Herráez y Zapata, 1991), en los que estas estructuras están asociadas con el procesado antigénico (Agius, 1985; Agius y Couchman, 1986). Aunque no hemos evidenciado la presencia de hemosiderina, que sí está presente en el bazo (Quesada y cols., 1990) y en el riñón cefálico (Meseguer y cols., 1991), consideramos que es debido a que en el timo no hay una destrucción de eritrocitos en número semejante al de bazo y riñón cefálico. Estos datos concuerdan con las indicaciones de Agius (1985) sobre distribución de pigmentos en los melanomacrófagos de órganos linfohematopoyéticos de teleósteos, en los que predominan lipofucsina y melanina como pigmentos mayoritarios y el pigmento hemosiderina está más restringido a los melanomacrófagos del bazo.

El significado funcional de estas células no está aclarado y son

numerosos los autores que relacionan estas células con la edad, ruptura de tejidos, deficiencias alimentarias, metabolismo del hierro y hemoglobina y estados patológicos, además del procesamiento antigénico (Agius, 1985; Agius y Couchman, 1986).

2.3. ZONA INTERNA.

La zona interna del timo de lubina se caracteriza por la presencia de un mayor número de CER y un menor número de células linfoides a diferencia de otras zonas del timo. Estructuralmente puede ser considerada análoga a la médula tímica de vertebrados superiores al igual que en otros teleósteos en los que esta misma zona recibe diferentes denominaciones como: zona interna en Astyanax mexicanus (Hafter, 1952), Tilapia mossambica (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b), Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983, 1985; Castillo y cols., 1987; Razquin y cols., 1990), Dicentrarchus labrax, Harpagifer antarcticus, Pleuragramma antarcticum, Merlangius merlangus, Notothenia neglecta, Nototheniops larseni (O'Neill, 1989a, b, c), Paralichthys olivaceus, Pragus major y Seriola quinqueradiata (Chantanachookhin y cols., 1991), zona medular o médula en Cyprinus carpio (Botham y Manning, 1981), Rutilus rutilus

(Zapata, 1981), Morone saxatilis (Groman, 1982), Sebastiscus marmoratus (Nakanishi, 1986) e Ictalurus punctatus (Ellsaesser y cols, 1988), zona basal o medular y zona subcapsular o periférica respectivamente en timo externo e interno de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), zona media en Zoarces viviparus (Bly, 1985), zona menos densa en Oryzias latipes (Ghoneum y cols., 1986) y zona subcapsular en Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990, 1991). Esta zona se continua con la zona externa de forma progresiva en su límite externo, mientras que internamente está delimitada por una capa de CER limitantes que la separa de la cápsula conectiva. A diferencia de lo observado en otras especies de teleósteos (Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983, 1985; Bly, 1985; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989a, b, c; Castillo y cols., 1990, 1991) la membrana basal, dispuesta entre el tejido conectivo subyacente y las CER limitantes, presenta discontinuidades como en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), a través de las cuales hemos podido observar intercambios celulares entre el parénquima tímico y el tejido conectivo.

El citoretículo de la zona interna del timo de lubina está formado por CER claras, intermedias y oscuras, a diferencia de lo descrito por O'Neill (1989b, c) con microscopía óptica en esta misma especie, quien no establece diferencias entre los componentes del estroma epitelio reticular, al igual que en otros teleósteos en los que sólo se ha descrito la existencia de un tipo de CER (Zapata, 1981; Gorgollón, 1983; O'Neill, 1989b, c). Sin embargo, en Salmo

gairdneri, Chilmonczyk (1983) describe dos tipos de CER, elongadas y estrelladas, pero recientemente en esta misma especie, mediante estudios histoquímicos, inmunocitoquímicos y ultraestructurales, Castillo y cols. (1990, 1991) observan un único tipo de CER, a las que denominan CER subcapsulares. Las CER oscuras son predominantes en esta zona y constituyen prácticamente el único componente del estroma en la región próxima a la cápsula conectiva; mientras que en la región limitante con la zona externa también aparecen CER claras e intermedias, en menor número. Esta distribución y abundancia relativa de estos tipos de CER concuerda con lo descrito en la médula del timo humano (van de Wijngaert y cols., 1984).

Es de destacar que, frecuentemente, las CER claras de esta zona del timo de lubina muestran estructuras ciliares y, al igual que las CER oscuras, cavidades quísticas intracitoplasmáticas de forma similar a lo descrito en las CER hipertróficas de Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985).

La zona interna del timo de Dicentrarchus labrax presenta como principales componentes, linfocitos de tamaño pequeño y mediano, distribuidos homogéneamente por todo el parénquima, y escasos linfoblastos que se encuentran en mayor proporción en áreas adyacentes a la cápsula conectiva y trabéculas. Una organización similar ha sido previamente descrita en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983), mientras que en Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983; Castillo y cols., 1990, 1991), Paralichthys olivaceus, Pragus major y Seriola

quinqueradiata (Chantanachookhin y cols., 1991) toda esta zona presenta un predominio de linfoblastos y algunos linfocitos medianos. Para algunos autores (Gorgollón, 1983; Castillo y cols., 1990, 1991) estas regiones del parénquima ricas en linfoblastos y próximas a la cápsula conectiva del timo de teleósteos serían equivalentes a la región subcapsular de la corteza tímica de vertebrados superiores (Hwang y cols., 1974; Gorgollón y Ottone-Anaya, 1978). En otras especies de teleósteos los linfoblastos están dispersos por todo el parénquima (Zapata, 1981; Schneider, 1983).

Destaca la presencia de procesos de muerte celular por apoptosis entre las células linfoides de esta zona del timo de lubina, que no han sido previamente descritas en teleósteos y que implica la existencia de selección negativa en el timo de lubina de forma similar a lo descrito en vertebrados superiores (Kendall, 1991).

En la zona interna del parénquima tímico de lubina aparecen células mucosas aisladas como en otros teleósteos (Gorgollón, 1983; O'Neill, 1989a, b, c). También han sido observadas células mucosas en el timo de vertebrados superiores donde pueden estar aisladas o asociadas a cavidades quísticas (Kendall y Frazier, 1979; Khosla y Ovalle, 1986; Raviola, 1987; Weiss, 1988; Zapata y Cooper, 1990). En lubina las células mucosas de la zona interna tienen el mismo patrón histoquímico que sus homólogas de la cápsula epitelial, pero presentan algunas diferencias morfológicas que indican un mayor estado de

madurez y por tanto pensamos que este tipo celular presente en la zona interna es originario del epitelio tímico, de acuerdo con lo que sugiere O'Neill (1989a, b, c), quien además sugiere que la internalización de este tipo celular podría estar relacionada con la temperatura.

A veces observamos células mucosas hipertróficas similares a las descritas previamente en esta misma especie, en Pleuragramma antarcticum (O'Neill, 1989b, c) y en Trematomus newnesi (O'Neill, 1989c), que representa el tipo más sencillo de estructura hipertrófica, ya que no llega a transformarse en estructuras quísticas como en otras especies de teleósteos en las que se forman estructuras quísticas delimitadas por CER (O'Neill, 1989c) e incluso por células mucosas (Hafter, 1952; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Tamura y Honma, 1977; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989c), al igual que en vertebrados superiores (Kendall y Frazier, 1979; Khosla y Ovalle, 1986; Raviola, 1987; Weiss, 1988; Zapata y Cooper, 1990).

El aumento de células mucosas con la edad y la formación de estructuras quísticas es un indicativo de involución tímica (O'Neill, 1989b, c), aunque también aparecen con frecuencia en timos hipertróficos que no presentan involución (MacArdle y Roberts, 1974).

Las células mioides aparecen en el timo de todas las clases de vertebrados (Rimmer, 1980; Zapata y Cooper, 1990). En lubina, como previamente ha sido descrito por O'Neill (1989b, c), observamos este tipo celular

formando parte del parénquima de la zona interna, con una morfología similar a las observadas en otros teleósteos (Hammar, 1909; Salkind, 1915; Hafter, 1952; Rizkalla, 1969; Zapata, 1981; Cooper y cols., 1990; Chilmoczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989c; Castillo y cols., 1990; Chantanachookhin y cols., 1991) y en otros vertebrados (Salkind, 1915; Henry, 1966; Feltramp-Vroom, 1967; Raviola y Raviola, 1967; Canaday, 1968; Ito y cols., 1969; Curtis y cols., 1972; Frazier, 1973; Oláh y cols., 1975; Hanzlikova, 1979; Zapata, 1980; Kendall, 1981b). Sin embargo, en algunas especies de teleósteos no se observan células mioides en el parénquima tímico (Engen, 1968; Bly, 1985; O'Neill, 1989a, b, c). En lubina las células mioides tienen diferente tamaño y grado de madurez y están aisladas o formando pequeños grupos como en Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985) y Paralichthys olivaceus (Chantanachookhin y cols., 1991) y rata (Hanzlikova, 1979). La fagocitosis de células mioides degeneradas (Hanzlikova, 1979; Fänge y Pulsford, 1985) y la migración de estas células hacia el tejido conectivo asociado (Fänge y Pulsford, 1985), descritas en otras especies, no se observan en lubina.

Actualmente, aunque el origen y función de estas células son materia de discusión, se considera que están asociadas a la involución tímica y a la enfermedad autoinmune "miastenia gravis" (Rimmer, 1980; Cooper y Tochiani, 1982; Nakamura y Ayer-Le Lievre, 1986; Zapata y Cooper, 1990).

Los corpúsculos tímicos, de Hassall o agregaciones esféricas de

CER que forman estructuras queratinizadas en vertebrados superiores (Weiss, 1988), no se han observado en el parénquima tímico de lubina confirmando las observaciones previas de O'Neill (1989b, c) en esta misma especie. La ausencia de corpúsculos de Hassall bien definidos también ha sido señalada en numerosos teleósteos (von Hagen, 1936; Hafter, 1952; Robertson y Wexler, 1960; Friedman, 1962; Smith y cols., 1967; Zapata, 1981; Chilmoczyk, 1983, 1985; O'Neill, 1989a, b, c). No obstante, en otras especies de teleósteos, se han descrito corpúsculos bien definidos (MacArdle y Roberts, 1974; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Tamura y Honma, 1977; Groman, 1982; Gorgollón, 1983; Ellsaesser y cols., 1988). Rowley y cols. (1988) consideran que la existencia de corpúsculos de Hassall en teleósteos es controvertida por hallarse sólo en algunas especies y presentar una notable heterogeneidad estructural y distinta a la típica morfología de estos agregados celulares. En el mismo sentido, Zapata y Cooper (1990) indican que sólo en vertebrados homeotermos, especialmente en mamíferos, aparecen verdaderos corpúsculos de Hassall y consideran que su existencia en vertebrados poiquilotermos, incluidos peces teleósteos, se corresponden a CER quísticas gigantes más o menos modificadas o a grupos de CER medulares como ocurre en elasmobranquios (Beard, 1900; Good y Papermaster, 1964; Fänge y Sundell, 1969), actinopterigios (Good y cols., 1966) y teleósteos (Hammar, 1909; Hafter, 1952; Dulzetto, 1968).

La función de los corpúsculos de Hassall es desconocida, aunque

en mamíferos hay aparentemente una correspondencia entre el comienzo de la competencia inmunológica humoral y la aparición de estas estructuras, que también estarían envueltas en los mecanismos relacionados con el desarrollo de la autotolerancia (Gorgollón, 1983; Zapata y Cooper, 1990).

La presencia de células interdigitadas en la zona interna del timo de lubina es destacable, porque no han sido observadas en ninguna otra especie de peces. Sin embargo, desde el descubrimiento de este tipo celular, su presencia ha sido confirmada en el timo de mamíferos (Veldman y Kaiserling, 1980; Duijvestijn y Hoefsmit, 1981; Kendall, 1981b; van Ewijk, 1988), aves (Kendall y Frazier, 1979; Fonfria y cols., 1982), reptiles (Leceta y cols., 1984) y anfibios (Bigaj y Plytycz, 1984, 1987; Alvarez, 1990).

Para identificar estas células en lubina hemos tenido en cuenta las características morfológicas que presentan en otros vertebrados (Kendall y Frazier, 1979; Veldman y Kaiserling, 1980; Duijvestijn y Hoefsmit, 1981; Fonfria y cols., 1982; Schutte y cols., 1983; Bigaj y Plytycz, 1984, 1987; Leceta y cols., 1984; van Ewijk, 1988; Alvarez, 1990) y que en síntesis son: protoplasma de baja electronodensidad, escasez de organelas membranosas, interdigitaciones de la membrana plasmática y la presencia de gránulos de Birbeck.

Aparecen aisladas o formando pequeños grupos similares a los observados en mamíferos (Veldman y Kaiserling, 1980) y aves (Fonfria y cols., 1982) y algunas veces contienen cuerpos densos y restos celulares, lo que nos

sugiere una capacidad fagocítica similar a la descrita en otros vertebrados (Veldman y Kaiserling, 1980; Duijvestijn y Hoefsmit, 1981; Kendall, 1981b; Duijvestijn y cols., 1982; Leceta y cols., 1984). Es de destacar la presencia ocasional, en el citoplasma, de este tipo celular del timo de lubina, de estructuras similares a las observadas en células interdigitadas de bazo del anuro Bufo calamita (Barrutia y cols., 1985) y a los gránulos de Birbeck de mamíferos (Veldman y Kaiserling, 1980; Duijvestijn y Hoefsmit, 1981; Schutte y cols., 1983), que están relacionados con el procesamiento de los complejos antígeno-anticuerpo (Schutte y cols., 1983).

La funcionalidad de las células interdigitadas, cuyo estudio se restringe prácticamente a mamíferos, y el origen son todavía materia de controversia. Estas células parecen ser constituyentes específicos del microambiente de las áreas T dependientes del sistema inmunitario de mamíferos, donde los estrechos contactos con los linfocitos parecen ser fundamentales para una adecuada transferencia de estímulos antigénicos (Veldman y Kaiserling, 1980). También se han apuntado funciones comunicativas o nutritivas (Zapata y Cooper, 1990). Algunos investigadores consideran que las células interdigitadas son un tipo especializado de macrófago implicado en la presentación de antígenos, mientras otros han propuesto un origen reticular y una función no asociada directamente con la inmunidad (Zapata y Cooper, 1990).

En lubina no hemos observado células plasmáticas, ni con técnicas microscópicas ópticas específicas ni con microscopía electrónica, al igual que en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983). Sin embargo, sí están presentes en el parénquima tímico de otros teleósteos como Lutjanus griseus (Hulet, 1967), Rutilus rutilus (Zapata, 1981), Cyprinus carpio (Schneider, 1983) y Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985), según ha sido demostrada con microscopía electrónica y mediante el método de células formadoras de placa hemolítica (PFC) en Lutjanus griseus, Mycteroperca bonaci (Ortiz-Muñiz y Sigel, 1971), Tilapia mossambica (Sailendri y Muthukkaruppan, 1975a) y Oncorhynchus kitsutch (Kaatari e Irwin, 1985). Sin embargo, hemos puesto de manifiesto la presencia de una población de células linfoides con sIg, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal frente a Ig M de suero de Sparus aurata (WSI-5) (Navarro y cols., 1993). El análisis con citometría de flujo nos da porcentajes similares a los previamente obtenidos en otras especies de teleósteos, Salmo gairdneri (DeLuca y cols., 1983) (u Oncorhynchus mykiss) (Thuvander y cols., 1990), Cyprinus carpio (Secombes y cols., 1983), Ictalurus punctatus (Ellsaesser y cols., 1988) y Sparus aurata (Navarro y cols., 1993), y que concuerdan con los de vertebrados superiores (Du Pasquier y Horton, 1982; Zapata y Cooper, 1990).

La obtención mediante reacción cruzada, en tимо de lubina, de un patrón de reconocimiento del anticuerpo monoclonal WSI-5 similar al conseguido en Sparus aurata (Navarro y cols., 1993) nos indica la presencia de

determinantes antigénicos comunes o estrechamente relacionados en las cadenas ligeras de la Ig M de ambas especies, que pertenecen al suborden Percoidei; a este respecto hemos de indicar que en la familia Salmonidae también ha sido descrita la existencia de reacción cruzada de un anticuerpo monoclonal frente a Ig M sérica de Oncorhynchus mykiss con Ig M de Salmo salar y S. trutta (Thuvander y cols., 1990).

Por tanto, considerando que en linfocitos de vertebrados superiores la presencia o ausencia de sIg se usa para definirlos como células B y T, respectivamente, (Raff, 1970), estamos de acuerdo con los autores que consideran la existencia en el timo de teleósteos de células equivalentes a B (DeLuca y cols., 1983; Secombes y cols., 1983; Ellsaesser y cols., 1988; Razquin y cols., 1990; Thuvander y cols., 1990; Navarro y cols., 1993). Los estudios sobre la existencia de heterogeneidad funcional entre las células linfoides del timo de Carasius auratus basados en el efecto hapteno-portador, no detectan la presencia de células hapteno reactivas (Células equivalentes a B) (Ruben y cols., 1977; Warr y cols., 1977). Sin embargo, los resultados de la respuesta frente a mitógenos evidencian la existencia de células funcionalmente equivalentes a células B (Cuchens y Clem, 1977; Warr y Simon, 1983; Ellsaesser y cols., 1988) que complementan, por tanto, los datos obtenidos con técnicas de marcaje.

Según Manning (1981), la existencia de células formadoras de anticuerpos en el timo de peces teleósteos le da carácter de órgano linfoide

secundario, lo que se podría justificar por el escaso desarrollo de los órganos linfoides secundarios en estos animales, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos. Por otro lado, la función de esta población de células intratímicas debe de ser importante a pesar de su baja frecuencia en el timo de vertebrados (Zapata y Cooper, 1990).

La presencia de células formadoras de anticuerpos en el timo se atribuye a una transgresión de la barrera hematotímica (Ortiz-Muñiz y Sigel, 1971; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975a), de acuerdo con lo demostrado para vertebrados superiores (Marshall y White, 1961) y su ubicación, según Razquin y cols. (1990), estaría en relación con la ramificación de las trabéculas conectivas que se extienden en el límite entre la cápsula epitelial y la zona externa del timo de peces; lo que se corresponde con lo descrito por Sainte-Marie y cols. (1986) en el timo de rata; donde las células plasmáticas aparecen en la zona córtico-medular, que es también el lugar de ramificación de las trabéculas conectivas. Según todas las indicaciones las células plasmáticas serían alóctonas y no clones producidos "in situ" (O'Neill, 1989b, c).

La actividad hematopoyética en el timo de vertebrados presenta diferencias entre las distintas clases e, incluso, interespecíficas. Así, se ha descrito capacidad eritropoyética en el timo de aves (Kendall y Frazier, 1979; Fonfria y cols., 1983) y en mamíferos, incluido el hombre, (Kendall 1980, 1981b; Kendall y Singh, 1980; Bourgeois y cols., 1981) y granulopoyética en mamíferos (Kendall,

1981b) y en el teleósteo Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983). También se ha observado actividad granulopoyética en el tejido conectivo peritímico del holósteo Amia calva (Hill, 1933), en ciprínidos (Davina y cols, 1980), en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y en vertebrados superiores (Kendall, 1981b).

En el timo de lubina hemos descrito áreas mielopoyéticas, donde es posible distinguir las series granulopoyética heterófila y eritropoyética. Estas áreas aparecen relegadas a uno de los lóbulos tímicos de modo similar a las áreas eritropoyéticas del timo de aves que aparecen únicamente en determinados lóbulos, caracterizados por su mayor tamaño (Kendall y Frazier, 1979; Fonfria y cols., 1983). En los lóbulos, donde aparecen áreas mielopoyéticas, éstas se localizan próximas a la cápsula conjuntiva de modo similar a lo descrito para las áreas granulopoyéticas heterófilas de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y para las áreas eritropoyéticas del timo de mamíferos (Oláh y cols., 1975; Bourgeois y cols., 1981; Kendall, 1981b). Estos lóbulos contienen pocos linfocitos y el estroma está formado por escasas CER oscuras y macrófagos que delimitan los islotes de células eritropoyéticas y granulopoyéticas. Esta estructura es idéntica a la descrita para las áreas eritropoyéticas de aves (Kendall y Frazier, 1979; Fonfria y cols., 1983) y para las granulopoyéticas de Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983).

La identificación morfológica de los distintos componentes celulares de la eritropoyesis y granulopoyesis de la serie heterófila presentes en

el timo concuerdan con las descripciones realizadas de las células eritrocíticas en riñón cefálico (Esteban y cols., 1989) y bazo (Villena, 1992) y de las células de la granulopoyesis de la serie heterófila en riñón cefálico (Meseguer y cols., 1990) de lubina.

Hemos de destacar que, a pesar de no haberse observado eritropoyesis en la mayoría de especies de teleósteos estudiadas, sí se ha descrito la presencia de eritrocitos maduros en otras especies de teleósteos (Hafter, 1952; Gorgollón, 1983; O'Neill, 1989c) y vertebrados, en los que aparecen normalmente (Zapata y Cooper, 1990).

La existencia de hematopoyesis en el timo ha sido relacionada con cambios microambientales, nutricionales y estrés. En relación con los cambios microambientales hemos de señalar que en lubina coexisten áreas mielopoyéticas y de necrobiosis en el mismo lóbulo tímico. Estas observaciones pueden relacionarse con lo descrito en aves por Fonfria y cols. (1983) donde la eritropoyesis intratímica está precedida por cambios microambientales que causan degeneración de las CER y aumento de macrófagos y linfocitos picnóticos. Por otro lado, en mamíferos se ha demostrado que los linfocitos T ejercen un cierto papel en la regulación de la eritropoyesis (Lipton y Nathan, 1981).

La presencia simultánea de distintos estadios de diferenciación de eritropoyesis y granulopoyesis en las mismas áreas del parénquima tímico de

lubina podría estar en consonancia con los resultados obtenidos "in vitro" tras la adición de suero de ratón anémico a cultivos de médula ósea de ratón granulopoyéticamente activos que produce la inhibición de la granulopoyesis e induce una eritropoyesis masiva (Dexter, 1981; Allen, 1981).

En cuanto a otras justificaciones a la existencia de eritropoyesis intratímica, podemos señalar que en aves se ha postulado que puede ser causada por un incremento en la demanda de eritrocitos en sangre circulante (como sucede durante la muda) o bien después de un periodo de estrés fisiológico, p. ej. inanición (como el causado durante la época de apareamiento), cuando la producción de eritrocitos está deprimida (Ward y Kendall, 1975; Kendall y Frazier, 1979; Fonfria y cols., 1983).

Como indica Kendall (1980) parece sorprendente que el timo pueda producir eritrocitos y granulocitos, ya que durante muchos años este órgano ha sido considerado como un órgano linfoide primario. Sin embargo, a pesar de la barrera hematotímica (cuya existencia actualmente se cuestiona), las células, indudablemente, entran en el parénquima tímico y, por tanto, es razonable asumir que de las diferentes células pluripotenciales presentes en sangre pueda producirse la entrada ocasional de unidades formadoras de colonias-granulocíticas (CFU-C) y/o unidades formadoras de colonias-eritroides (CFU-E) que serían las responsables de la granulopoyesis y eritropoyesis intratímicas, respectivamente, aunque exista, preferentemente, una entrada

selectiva de las células precursoras de células T o unidades formadoras de colonias-bazo (CFU-S) (Yoffey, 1981). El hecho de que el timo pueda hospedar otras líneas celulares, además del linaje de los linfocitos T, podría explicar la heterogeneidad morfológica entre las células blasto observada en timos normales (Kendall, 1981b).

La presencia de otras actividades hematopoyéticas, como la granulopoyesis y/o la eritropoyesis, y en concreto esta última implicaría una respuesta no inmunológica del órgano; por tanto, deben esperarse futuras aclaraciones sobre el comportamiento y potencialidades de las células pluripotenciales para conocer si la aparición de la eritropoyesis es accesoria a las funciones normales del órgano (p. ej. los factores del cuerpo que instigan el aumento de la eritropoyesis son tan potentes que todos los tejidos que pueden abrigar eritrocitos en desarrollo son forzados a usarse) o necesaria (p. ej. el timo siempre tiene potencialidad para desarrollar la eritropoyesis pero normalmente está inhibida o no estimulada) (Kendall, 1981b).

Ante estos resultados sería conveniente referirse al timo como un órgano hematopoyético en el cual la diferenciación celular normalmente favorece la línea linfoide (como la médula tiende a favorecer la granulopoyesis y eritropoyesis) y buscar los factores del microambiente que influyen sobre otras posibles funciones (Kendall, 1980).

2.4. CAPSULA CONECTIVA Y TRABECULAS.

La cápsula conectiva del timo de lubina como en todos los teleósteos estudiados se dispone entre el parénquima tímico y la musculatura epaxial de la cabeza y está separada del tejido linfoide por una membrana basal y una capa de CER limitantes (Hafter, 1952; Friedman, 1962; Rizkalla, 1969; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b; Grace y Manning, 1980; Botham y Manning, 1981; Zapata, 1981; Groman, 1982; Chilmonczyk, 1983, 1985; Bly, 1985; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989c, Castillo y cols., 1990, 1991; Razquin y cols., 1990; Chantanachookhin y cols., 1991). Esta cápsula es similar a la cápsula tímica de vertebrados superiores (Oláh y cols., 1975; Zapata y Cooper, 1990).

En lubina el tejido conectivo de la cápsula conectiva se adentra en el parénquima tímico formando trabéculas o septos que presentan la misma estructura de separación con el parénquima tímico que la cápsula conectiva, discurriendo por ellas los vasos sanguíneos al igual que en todos los teleósteos estudiados.

En lubina, como en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983) y Salmo gairdneri (Castillo y cols., 1990), las trabéculas penetran perpendiculares a la

superficie tímica a través del parénquima y en el límite entre la cápsula epitelial y la zona externa se ramifican discurriendo paralelamente al epitelio tímico. La membrana basal que separa el tejido conectivo, subyacente y trabecular, de las CER limitantes presenta discontinuidades a través de las cuales hay tránsito celular. Gorgollón (1983) también ha descrito estas discontinuidades de la membrana basal en Syciases sanguineus, pero no observa el paso de células. Lo que concuerda con Chilmonczyk (1983), quien indica que las trabéculas no deben ser consideradas únicamente como mero soporte de los vasos asociados a ellas, sino que deben de tener un papel importante en la migración de las células del timo.

El tejido conectivo asociado al timo de lubina presenta una considerable infiltración de linfocitos, granulocitos y eritrocitos como ha sido descrito en otros teleósteos (Tamura y Honma, 1974, 1975; Chilmonczyk, 1983, 1985; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985). Sin embargo, no presenta guanóforos, melanóforos ni células mioides como en Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985) y tampoco centros melanomacrofágicos como en Syciases sanguineus (Gorgollón, 1983).

3. VASCULARIZACION.

La vascularización del timo de lubina está relacionada con el sistema vascular branquial y penetra desde la cápsula conectiva a través de las trabéculas, que se ramifican al mismo tiempo que los vasos sanguíneos, como ha sido indicado en otros teleósteos (Salkind, 1915; Tamura y Honma, 1974, 1975, 1977; Sailendri y Muthukkaruppan, 1975b, Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983; Gorgollón, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989a, b, c).

Los vasos sanguíneos intratrabeculares en lubina, como en otras especies de teleósteos (Zapata, 1981; Chilmonczyk, 1983; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989b, c) y vertebrados superiores (Weiss, 1963; Kameya y Watanabe, 1965; Kostowiecki, 1967; Raviola y Karnovsky, 1972; Abe e Ito, 1974; Bearman y cols., 1978), presentan barrera hematotímica a nivel de la zona externa; mientras que en la zona interna dudamos de la existencia de barrera hematotímica porque hemos observado paso de células a través de la capa de CER limitantes. También a nivel de la zona interna los capilares que abandonan las trabéculas aparecen en algunos casos limitados por una capa discontinua de CER limitantes como en Salmo gairdneri (Chilmonczyk, 1983, 1985) o bien carecen de envoltura epitelio reticular limitante, como ya ha sido previamente descrito por O'Neill (1989b, c) en Dicentrarchus labrax y Pleuragramma

antarcticum, a diferencia de lo descrito en Rutilus rutilus (Zapata, 1981) y Lophius piscatorius (Fänge y Pulsford, 1985).

A pesar de la presencia morfológica de una barrera hematotómica (Zapata, 1981, 1983) y de los resultados derivados de experimentos de estimulación antigénica vía sangre y de circulación de linfocitos (Ellis y De Sousa, 1974; Ellis y cols., 1976; Ellis, 1980), que indican la existencia de un aislamiento antigénico del timo, son numerosos los autores que cuestionan, al igual que nosotros, un total aislamiento antigénico y la capacidad de autorreconocimiento en el timo de teleósteos (Ellis, 1982; Tatner y Manning, 1982; Chilmonczyk, 1983, 1985; Fänge, 1984; Fänge y Pulsford, 1985; O'Neill, 1989b, c). Estas mismas cuestiones, se están planteando en la actualidad, incluso, en vertebrados superiores (Kendall, 1991).

VI. CONCLUSIONES

Primera:

En el parénquima tímico de lubina se diferencian tres zonas: cápsula epitelial constituida por el epitelio tímico y la región subepitelial, zona externa y zona interna.

Segunda:

La cápsula conectiva emite trabéculas que penetran perpendicularmente a la superficie tímica. Las trabéculas forman una trama paralela al epitelio tímico, separado parcialmente al parénquima de la cápsula epitelial y de la zona externa. Filogenéticamente, este tipo de estructura podría representar una etapa en el proceso de separación del timo del epitelio de la cavidad branquial.

Tercera:

En la región subepitelial de la cápsula epitelial del timo de lubina se observan distintos estadios de diferenciación de las células mucosas.

Cuarta:

El estroma epitelio reticular del timo de lubina está constituido por CER

limitantes, claras, intermedias y oscuras. Las CER claras del timo de lubina establecen estrechas relaciones puntuales con los linfocitos. Las CER intermedias, que no han sido identificadas con anterioridad en el timo de peces, envuelven a los linfocitos con su citoplasma y posiblemente tengan una funcionalidad equivalente a las células "nurse" del timo de vertebrados superiores. Las características morfológicas de los distintos tipos de CER presentes en el timo de lubina sugieren la existencia de un proceso de diferenciación desde CER claras hasta oscuras, similar al propuesto en vertebrados superiores, lo que estaría en controversia con los autores que defienden la naturaleza estática del estroma tímico.

Quinta:

Los linfoblastos aparecen, principalmente, en el parénquima de la zona externa superficial y de la zona interna adyacente a la cápsula conectiva, formando áreas similares a las descritas en la región subcapsular de la corteza tímica de vertebrados superiores.

Sexta:

En el timo de lubina existe una subpoblación de linfocitos con inmunoglobulinas de superficie, de acuerdo con lo indicado por otros autores sobre la existencia de linfocitos equivalentes a células B en el

timo de teleósteos. Sin embargo, no hemos observado células plasmáticas.

Séptima:

Las células linfoides del timo de lubina sufren procesos de muerte celular por apoptosis, fenómeno que no ha sido descrito previamente en el timo de peces y que indica la existencia de procesos de selección negativa durante la diferenciación intratímica de los linfocitos, de acuerdo con lo descrito en vertebrados superiores.

Octava:

En el timo de lubina no hay corpúsculos de Hassall ni cavidades quísticas o estructuras similares, aunque en las CER claras y oscuras sí existen cavidades quísticas intracitoplasmáticas.

Novena:

En el parénquima tímico de la zona interna del timo de lubina existen células interdigitadas, no descritas previamente en el timo de peces.

Décima:

En el parénquima tímico de lubina hay áreas mielopoyéticas, con actividad eritropoyética y granulopoyética heterófila.

Undécima:

En el parénquima de la zona interna se observan áreas de necrobiosis.

Duodécima:

El parénquima tímico de lubina está separado de la cavidad branquial por una simple capa discontinua de células epiteliales. Entre estas células se forman criptas con células mucosas, de cloruro y/o macrófagos en la base, no descritas previamente en el timo de peces. La fragilidad de la barrera epitelial puede verse incrementada por la presencia de macrófagos intraepiteliales que emiten proyecciones citoplasmáticas al exterior, pudiendo jugar un papel importante en la captación de antígenos. A este respecto hemos de indicar la presencia en el timo de lubina de una subpoblación de macrófagos con inmunoglobulinas de superficie. Todo ello implica la posibilidad de un intercambio antigénico entre el medio externo y el tejido linfoide.

Décimotercera:

En la zona interna del timo de lubina, a través de la capa de CER limitantes y de capilares sanguíneos sin envoltura epitelio reticular hay tránsito de células sanguíneas; por lo que no hay un total aislamiento antigénico del timo de lubina. Careciendo de barrera hematotímica, al

menos, a este nivel.

Décimocuarta:

Los datos morfofuncionales, la posibilidad de un acceso fácil de los antígenos al parénquima tímico, la presencia de macrófagos en estrecha interacción con linfocitos y la existencia de melanomacrófagos aislados y en agregados sugieren la existencia de procesos antígeno dependientes y, por tanto, la persistencia de funciones propias de órgano linfoide secundario en el timo de lubina.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abe K, Ito T (1974) Tubular complex of small lymphocytes in lymphatic tissue of the mouse. *Arch Histol Jpn* 37:133-142.
- Agius C (1985) The melano-macrophage centres of fish: A review. En: "Fish Immunology", eds. MJ Manning, MF Tatner, pp. 85-105, Academic Press. London.
- Agius C, Couchman W (1986) Induction of enhanced alkaline phosphatase activity in the melano-macrophage centres of Oreochromis aureus (Steindachner) through starvation and vaccination. *J Fish Biol* 28:87-92.
- Ainsworth AJ, Dexiang C, Greenway T (1990) Characterization of monoclonal antibodies to channel catfish, Ictalurus punctatus, leucocytes. *Vet Immunol Immunopath* 26:81-92.
- Allen TD (1981) Haemopoietic microenvironments in vitro: ultrastructural aspects. En: "Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation", ed. Ciba Foundation Symposium 84, pp. 38-67, Pitman. London.
- Alvarez R (1990) Thymus of Rana perizi: presence of interdigitating cells. *J Morph* 204:305-312.
- Ambrosius H, Fiebig H, Scherbaum I (1982) Phylogenetic aspects of fish immunoglobulins and lymphocyte receptors. *Dev Comp Immunol Suppl* 2:3-13
- Andrew W (1952) "Cowdrey's problems of ageing", 3^a ed, pp. 527-561, Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- Ardavin CF, Gomariz RP, Barrutia MG, Fonfria J, Zapata A (1984) The lympho-hemopoietic organs of the anadromous sea lamprey Petromyzon marinus: A comparative study throughout its life span. *Acta Zool Stockh* 65:1-15.
- Ardavin CF, Zapata A (1988) The pharyngeal lymphoid aggregates of lampreys: a morpho-functional equivalent of the vertebrate thymus?. *Thymus* 11:59-65.
- Avtalion RR, Weiss E, Moalem T, Milgrom L (1975) Evidence for cooperation of T and B cells in fish. *Isr J Med Sci* 11:1358.
- Barnabé G (1976) Contribution à la connaissance de la biologie du loup Dicentrarchus labrax (L.) (Poisson Serranidae). Thèse Doctorat Etat, Mention Sciences, Univ Sc. Techn. Languedoc, Montpellier, Mus Nat Hist Nat., Inst. d'Ethnologie (1979), Publ. SN 76 601 229, 7 micro-fiches.
- Barnabé G (1980) Exposé synoptique des données biologiques sur le loup ou bar Dicentrarchus labrax (Linné, 1758). *Synopsis, FAO Pêches*, 126:70.
- Barnabé G (1991) "Acuicultura. Vol II", ed. Omega, S.A., Barcelona.
- Barnabé G, René F (1972) Reproduction contrôlée du loup Dicentrarchus labrax (Linné) et production en masse d'alevins. *C R Acad Sc Paris* 275(D):2741-2744.

- Barrutia MG, Villena A, Razquin B, Gomariz RP, Zapata A (1985) Presence of presumptive interdigitating cells in the spleen of the natterjack Bufo calamita. *Experientia* 41:1393-1394.
- Beard J (1894) The development and probable function of the thymus. *Anat Anz* 9:476-486.
- Beard J (1900) The source of leucocytes and the true function of the thymus. *Anat Anz* 18:550-560.
- Beard J (1903) The origin and histogenesis of the thymus in Raja batis. *Zool Jb* 17:403-480.
- Bearman RM, Levine GD, Bensch KG (1978) The ultrastructure of the normal human thymus: A study of 36 cases. *Anat Rec* 190:755-781.
- Bennett G (1978) Synthesis and migration of glycoproteins in cells of the rat thymus, as shown by radioentography after 3H-fucose injection. *Amer J Anat* 152:223-256.
- Bigaj J, Dulak J, Plytycz B (1987) Lymphoid organs of Gasterosteus aculeatus *J Fish Biol* 31 (Suppl A):233-234.
- Bigaj J, Plytycz B (1984) Cytoarchitecture of the thymus gland of the adult frog Rana temporaria. *Folia Histochem Cytobiol* 22:63-70.
- Bigaj J, Plytycz B (1987) Interdigitating cells in the thymus of the frog Rana temporaria. *Folia Histochem Cytobiol* 24:65-68.
- Bly JE (1985) The ontogeny of the immune system in the viviparous teleost Zoarces viviparus L. En: "Fish Immunology", eds. MJ Manning, MF Tatner, pp. 327-341, Academic Press. London.
- Bockman DE, Winborn WB (1967) Electron microscopy of the thymus in two species of snakes Crotalus atrox and Lampropeltis getulus. *J Morph* 121:277-294.
- Bone Q, Marshall NB (1982) "Biology of fishes", Blackie, London.
- Born W, Wekerle H (1982) Lympho-stromal interactions in the thymus: medullary thymocytes react with I-A determinants on autochthonous thymic stimulator cells. *Eur J Immunol* 12:51-60.
- Botham JW, Grace Mf, Manning MJ (1980) Ontogeny of first set and second set alloimmune reactivity in fishes. En: "Phylogeny of Immunological Memory", ed. MJ Manning, pp. 83-92, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Botham JW, Manning MJ (1981) Histogenesis of the lymphoid organs in the carp Cyprinus carpio L. and the ontogenic development of allograft reactivity. *J Fish Biol* 19:403-414.
- Bou Ain A (1977) Contribution à l'étude morphologique, anatomique et biologique de Dicentrarchus labrax (Linne, 1758) et Dicentrarchus punctatus (Bloch, 1792) des côtes tunisiennes. Thèse de Doctorat de Spécialité, Faculté des Sciences, Tunis. Túnex.
- Bourgeois N, Bergmans G, Buysens N (1981) The thymus as haemopoietic tissue of non-lymphoid

- cells. *Virchows Arch* 391:81-89
- Burne RH (1927) A contribution to the anatomy of the ductless glands and lymphatic system of the Angler fish, *Lophius piscatorius*. *Phil Trans R Soc London B* 215:1-56.
- Canaday SD (1968) Light and electron microscopy of the thymus in adult *Rana pipiens*. *Anat Rec* 160:326-335.
- Caspi RR, Shahrabani R, Kehani-Dan T, Avtalion RR (1984) Heterogeneity of mitogen-responsive lymphocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Dev Comp Immunol* 8:61-70.
- Castillo A, Razquin B, López-Fierro P, Alvarez F, Zapata AG, Villena A (1987) An enzyme-histochemical study of the stromal cells and vascularization of the lymphoid organs of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. *Cuad Marisqu Publ Téc* 12:167-172.
- Castillo A, Razquin B, López-Fierro P, Alvarez F, Zapata AG, Villena A (1990) Enzyme- and immuno-histochemical study of the thymic stroma in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. *Thymus* 36:159-173.
- Castillo A, López-Fierro P, Zapata A, Villena A, Razquin B (1991) Post-hatching development of the thymic epithelial cells in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: An ultrastructural study. *Am J Anat* 190:299-307.
- Chantanachookhin C, Seikal T, Tanaka M (1991) Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture* 99:143-155.
- Chilmonczyk S (1982) Rainbow trout lymphoid organs; cellular effects of corticosteroids and anti-thymocyte serum. *Dev Comp Immunol* 6:271-280.
- Chilmonczyk S (1983) The thymus of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Light and electron microscopic study. *Dev Comp Immunol* 7:59-68.
- Chilmonczyk S (1985) Evolution of the thymus in rainbow trout. En: "Fish Immunology", eds. MJ Manning, MF Tatner. pp. 285-292, Academic Press. London.
- Clark SL (1966) Cytological evidences of secretion in the thymus. En: "The thymus: experimental and clinical studies. Ciba Foundation symposium", eds. GEM Wolstenholme, R Porter, pp. 3-38, JA Churchill Ltd. London.
- Clark SL (1968) Incorporation of sulphate by the mouse thymus; its relation to secretion by medullary epithelial cells and to thymic lymphopoiesis. *J Exp Med* 128:927-957.
- Clem LW, McLean WE, Shankey VT, Cuchens MA (1977) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. I. Membrane immunoglobulins of teleost lymphocytes. *Dev Comp Immunol* 1:105-118.
- Clem LW, Sizemore EC, Ellsaesser CF, Miller NW (1985) Monocytes as accessory cells in fish immune responses. *Dev Comp Immunol* 9:803-809.

- Cohen N (1977) Phylogenetic emergence of lymphoid tissue and cells. En: "The lymphocyte: structure and function", ed. JJ Marchalonis, pp. 149-202, Marcel Dekker. New York.
- Colbert EH, Morales M (1991) "Evolution of the vertebrates. A history of the backbone animals through time", 4^a ed, Wiley-Liss. New York.
- Cooper EL (1967) Lymphomyeloid organs of amphibia. I. Appearance during larval and adult stages of Rana catesbeiana. J Morph 122:381-398.
- Cooper EL (1973) The thymus and lymphomyeloid system in poikilothermic vertebrates. En: "Contemporary topics in immunobiology Vol. 2", eds. AJS Davies, RL Carter, pp. 13-38, Plenum Publishing. New York.
- Cooper EL, Hildemann WH (1965) Allograft reactions in bullfrog larvae in relation to thymectomy. Transplantation 3:446-448.
- Cooper EL, Tochinal S (1982) Myasthenia gravis and thymus myoid cells. En: "Developmental immunology: Clinical problems and aging", eds. EL Cooper, MAB Brazier, pp. 209-214, Academic Press. New York.
- Cooper EL, Zapata A., Garcia-Barrutia M., Ramirez JA (1983) Aging changes in lymphopoietic and myelopoietic organs of the annual cyprinodont fish, Nothobranchius guentheri. Exp Gerontol 18:29-38.
- Cordier AC (1974) Ultrastructure of the thymus in "Nude" mice. J Ultrastruct Res 47; 26-40.
- Csaba G, Barath P (1975) (Citado por Tamura E, Honma Y (1977) Histological changes in the organs and tissues of the gobiid fishes throughout their life-span. VIII. Seasonal changes in the thymus of four species of gobies. Bull Jap Soc Scient Fish 43:963-974).
- Cuchens MA, Clem LW (1977) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. II. Differential effects of temperature on fish T-like and B-like cells. Cell Immunol 34:219-227.
- Cuchens M, McLean E, Clem LW (1976) Lymphocyte heterogeneity in fish and reptiles. En: "Phylogeny of thymus and bone marrow bursa cells", ed. RK Wright, EL Cooper, pp. 205, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Curtis SK, Cowden RR, Nagel JW (1979) Ultrastructural and histochemical features of the thymus glands of the adult lungless salamander Plethodon glutinosus (Caudata: Plethodontidae). J Morph 160:241-274.
- Curtis SK, Volpe EP, Cowden RR (1972) Ultrastructure of the developing thymus of the leopard frog (Rana pipiens). Z Zellforsch 127:323-346.
- Davina JHM, Rijkers GT, Rombout JHWM, Timmermans LPM, van Mulswinkel WB (1980) Lymphoid and non-lymphoid cells in the intestine of cyprinid fish. En: "Development and differentiation of vertebrate lymphocytes", ed. JD Horton, pp. 129-140, Elsevier North Holland Biomedical Press. Amsterdam.

- Deansley R (1927) The structure and development of the thymus in fish with special reference to Salmo fariq. Q Jl Microsc Sci 71:113-145.
- DeLuca D, Wilson M, Warr GW (1983) Lymphocyte heterogeneity in the trout, Salmo gairdneri, defined with monoclonal antibodies to IgM. Eur J Immun 13:546-551.
- Dexter TM (1981) Self-renewing haemopoietic progenitor cells and the factors controlling proliferation and differentiation. En: "Microenvironments in haemopoietic and lymphoid differentiation", ed. Ciba Foundation Symposium 84, pp. 22-37, Pitman. London.
- Dieuzeide R, Novella M, Roland J (1954) Catalogue des poissons des côtes algériennes. 2: Ostéoptérygiens. Bull St Aquacult Pêche Castiglione. 5:258.
- Dipasquale B, Tridente G (1991) Immunohistochemical characterization of nurse cells in normal human thymus. Histochemistry 96:499-503.
- Duijvestijn AM, Hoefsmit ECM (1981) Ultrastructure of the rat thymus: The microenvironment of T-lymphocyte maturation. Cell Tissue Res 218:279-292.
- Duijvestijn AM, Köhler YG, Hoefsmit ECM (1982) Interdigitating cells and macrophages in the acute involuting rat thymus. An electron microscopy study on phagocytic activity and population development. Cell Tissue Res 224:291-301.
- Duijvestijn AM, Schutte R, Köhler YG, Korn C, Hoefsmit ECM (1983) Characterization of the population of phagocytic cells in thymic cell suspensions. A morphological and cytochemical study. Cell Tissue Res 231:313-325.
- Dulzetto F (1968) Timo. En: "Anatomia Comparata dei Vertebrati", pp. 2148-2153, Edizioni Calderini. Bologna.
- Du Pasquier L (1973) Ontogeny of the immune response in cold-blooded vertebrates. Cur Top Microbiol Immunol 1:37-88.
- Du Pasquier L (1976) Amphibian models for study of the ontogeny of immunity. En: "Comparative immunology", ed. JJ Marchalonis, pp. 390-418. Blackwell. Oxford.
- Du Pasquier L, Horton JD (1982) Restoration of antibody responsiveness in early thymectomized Xenopus by implantation of major histocompatibility complex-mismatched larval thymus. Eur J Immunol 12:546-551.
- Egberts E, Secombes CJ, Wellink JE, van Groningen JJM, van Muiswinkel WB (1983) Analysis of lymphocyte heterogeneity in carp, Cyprinus carpio L., using monoclonal antibodies. Dev Comp Immunol 7:749-754.
- Ellis AE (1976) Leucocytes and related cells in the plaice Pleuronectes platessa. J Fish Biol 8:143-156.
- Ellis AE (1977) Ontogeny of the immune response in Salmo salar. Histogenesis of the lymphoid

- organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity. En: "Developmental Immunobiology", eds. JB Solomon, JD Horton, pp. 225-231, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Ellis AE (1980) Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice Pleuronectes platessa L. J Fish Dis 3:413-426.
- Ellis AE (1982) Differences between the immune mechanisms of fish and higher vertebrates. En: "Microbial diseases of fish", ed. RJ Roberts, pp. 1-29, Academic Press. London.
- Ellis AE (1989) The immunology of teleosts. En: "Fish Pathology", ed. RJ Roberts, pp. 135-152, Baillière Tindall. Londres.
- Ellis AE, De Sousa M (1974) Phylogeny of the lymphoid system. 1. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice (Pleuronectes platessa L). Eur J Immunol 4:338-343.
- Ellis AE, Munroe ALS, Roberts RJ (1976) Defence mechanisms in fish. I. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (Pleuronectes platessa L.). J Fish Biol 8:67-78.
- Ellis AE, Parkhouse RME (1975) Surface immunoglobulins on the lymphocytes of the skate (Raja naevus). Eur J Immunol 5:726-728.
- Ellis AE, Roberts RJ, Tytler P (1989) The anatomy and physiology of teleosts. En: "Fish Pathology", pp. 13-55, ed. RJ Roberts. Baillière Tindall. Londres.
- Ellsaeser CF, Bly JE, Clem LW (1988) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the thymus of the channel catfish. Dev Comp Immunol 4:787-799.
- Emmrich F, Richter R, Ambrosius H (1975) Immunoglobulin determinants on the surface of lymphoid cells of carp (Cyprinus carpio). Eur J Immunol 5:76-78.
- Engen PC (1968) Organogenesis in the walleye surfperch, Hyperprosopon argenteum (Gibbons). Calif Fish Game 54:156-169.
- Esteban MA, Meseguer J, García Ayala A, Agulleiro B (1989) Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head-kidney of the sea bass (Dicentrarchus labrax L.): an ultrastructural study. Arch Histol Cytol 52:407-419.
- Etlinger HM, Hodgins HO, Chiller JM (1976) Evolution of the lymphoid system. I. Evidence for lymphocyte heterogeneity in rainbow trout revealed by organ distribution of mitogenic responses. J Immunol 116:1547-1553.
- Fänge R (1977) Size relations of lymphomyeloid organs in some cartilaginous fish. Acta Zool Stockh 58:125-128.
- Fänge R (1982) A comparative study of lymphomyeloid tissue in fish. Dev Comp Immunol Suppl 2:23-33.

- Fänge R (1984) Lymphomyeloid tissues in fishes. *V Med Nat Foren* 145:143-162.
- Fänge R (1986) Lymphoid organs in sturgeons (Acipenseridae). *Vet Immunol Immunopathol* 12:153-161.
- Fänge R (1987) Lymphomyeloid system and blood cell morphology in elasmobranchs. *Arch Biol Bruxelles* 98:178-208.
- Fänge R, Pulsford A (1985) The thymus of the angler fish (Lophius piscatorius, Pisces: Teleostei): A light and electron microscopic study. En: "Fish Immunology", eds. MJ Manning, MF Tatner, pp. 293-311, Academic Press. London.
- Fänge R, Sundell G (1969) Lymphomyeloid tissues, blood cells and plasma proteins in Chimaera monstrosa (Pisces, Holocephali). *Acta Zool Stockh* 50:155-168.
- Feltramp-Vroom T (1967) Myoid cells in human thymus. *Lancet* 1:1320-1321.
- Fiebig H, Ambrosius H (1976) Cell surface immunoglobulin of lymphocytes in lower vertebrates. En: "Phylogeny of thymus and bone marrow bursa cells", eds. RK Wright, EL Cooper, pp. 195, Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam.
- Fiebig H, Scherbaum I, Ambrosius H (1977) Zelloberflächen-immunglobulin von lymphozyten des karpfens (Cyprinus carpio L.). *Acta Biol Med Germ* 36:1167-1177.
- Fiebig H, Scherbaum I, Ambrosius H (1980) Evolutionary origin of the T lymphocyte receptor. I. Immunochemical investigation of immunoglobulin-like cell surface protein of carp thymocytes. *Molec Immunol* 17:971-984.
- Fiebig H, Scherbaum I, Kraus G, Kupper H (1983) Characterization of carp lymphocyte receptors by monoclonal antibodies and conventional antisera. *Dev Comp Immunol* 7:755-756
- Finstad J, Papermaster BW, Good RA (1964) Evolution of the immune response. II. Morphologic studies on the origin of the thymus and organized lymphoid tissue. *Lab Invest* 13:490-512.
- Fonfria J, Barrutia MG, Garrido, E, Ardavin, CF, Villena A, Zapata A (1983) Erythropoiesis in the thymus of the spotless starling Sturnus unicolor. *Cell Tissue Res* 232:445-455.
- Fonfria J, Barrutia MG, Villena A, Zapata A (1982) Ultrastructural study of interdigitating cells in the thymus of the spotless starling Sturnus unicolor. *Cell Tissue Res* 225:687-691.
- Frazier JA (1973) Ultrastructure of the chick thymus. *Z. Zellforsch* 136:191-205.
- Friedman LR (1962) A study of normal and malignant thymus tissue of the teleost Astyanax mexicanus in tissue culture. *Bull Amer Mus Nat Hist* 124:73-80.
- Frohely MF, Deschaux PA (1986) Presence of tonofilaments and thymic serum factor (FTS) in thymic epithelial cells of a fresh water fish (Carp: Cyprinus carpio) and a seawater fish

- (Bass: Dicentrarchus labrax). Thymus 8:235-244.
- Fujii T (1982) Electron microscopy of the leucocytes of the typhlosole in ammocoetes, with special attention to the antibody-producing cells. J Morphol 173:87-100.
- Gabe M (1968) "Techniques histologiques", eds. Masson y Cie, Paris.
- Gérard P (1933) Sûr le système athrophagocytaire chez l'ammocoète de la Lampetra planeri (Bloch). Archs Biol Liège 44:327-346.
- Ghoneum MH, Egami N, Ijiri K, Cooper EL (1986) Effect of corticosteroids on the thymus of the fish Oryzias latipes. Dev Comp Immunol 10:35-44.
- Gilmore StC, Bridges JB (1974) Histological and ultrastructural studies on the myoid cells of the thymus of the domestic fowl Gallus domesticus. J Anat 118:409-416.
- Good RA, Dalmaso AP, Martinez C, Archer OK, Pierce JC, Papermaster BW (1962) The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice. J Exp Med 116:773-796.
- Good RA, Finstad J, Pollara B, Gabrielsen AE (1966) Morphological studies on the evolution of the lymphoid tissues among the lower vertebrates. En: "Phylogeny of Immunity", eds. RT Smith, PA Miescher, RA Good, pp. 149-168, University of Florida Press. Gainesville.
- Good RA, Papermaster BW (1964) Ontogeny and phylogeny of adaptative immunity. Avd. Immunol 4:1-115.
- Gorgollón P (1983) Fine structure of the thymus in the adult cling fish Sicyases sanguineus (Pisces, Gobiesocidae). J Morph 177:25-40.
- Gorgollón P, Ottone-Anaya M (1978) Fine structure of canine thymus. Acta Anat. 100:136-152
- Grace MF, Manning MJ (1980) Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, Salmo gairdneri Rich. 1836. Dev Comp Immunol 4:255-265.
- Grizzley JM, Rogers WA (1976) "Anatomy and histology of the channel catfish". Auburn University Agricultural Experiment Station. Auburn.
- Groman DB (1982) Hematopoietic tissue. En: "Histology of the striped bass", ed. American Fisheries Society, pp. 14-18, Bethesda, Maryland.
- Haftner E (1952) Histological age changes in the thymus of the teleost Astyanax mexicanus. J Morphol 90:555-581.
- Hammar JA (1905) Zur histogenese und involution der thymusdruse. Anat Anz 27: 23-30.
- Hammar JA (1909) Funfzig jahre thymusforschung ergebn. Anal EntwGesch Anat Hefte Zte Abt 19:1-274.

- Hammar JA (1911) Zur kenntnis der elasmobranchier-thymus. Zool Jahrb Abt Anat 32:135-180.
- Hansen L (1895) Les colorations topografiques. En: "Techniques histologiques", pp. 206, Masson et cie. ed. Paris.
- Hanzlikova V (1979) Histochemical and ultrastructural properties of myoid cells in the thymus of the frog. Cell Tissue Res 197:105-112.
- Hardisty MW (1979) "Biology of cyclostomes". Chapman and Hall. London.
- Henry K (1966) Mucin secretion and striated muscle in the human thymus. Lancet 1:183-185.
- Henry M, Charlemagne J (1981) Development of amphibian thymi. II. Sequential occurrence of two epithelial cell types in the urodele Pleurodeles waltlii. Dev Comp Immunol 5:449-460.
- Herráez MP, Zapata AG (1991) Structural characterization of the melano-macrophage centres (MMC) of goldfish Carassius auratus. Eur J Morphol 29(2):89-102.
- Hightower JA, St Pierre RL (1971) Hemopoietic tissue in the adult newt Notophthalmus viridescens. J Morph 135:299-308.
- Hill BH (1935) The early development of the thymus glands of Amia calva. J Morphol 57:61-89.
- Honma Y, Tamura E (1972) Studies on the endocrine glands of a salmonid fish, the ayu, Plecoglossus altivelis Temmiach et Schlegel. Degenerative changes in the thymus of kuaya exposed to artificial photoperiods. Bull Jap Soc Scient Fish 38:995-1005.
- Honma Y, Tamura E (1984) Histological changes in the lymphoid system of fish with respect to age, seasonal and endocrine changes. Dev Comp Immunol Suppl 3:239-244.
- Honma Y, Tamura E, Chiba A (1985) Seasonal thymic activity in relation to the reproductive endocrine activity in the viviparus surfperch, Ditrema temmincki. En: "Current trends in comparative endocrinology, Hong Kong", eds. B Lofts, WN Holmes, pp. 223-224, University Press. Hong Kong.
- Hulet WH (1967) Antibody production "in vitro" by tissues of homothermic and poikilothermic vertebrates. Ph D Thesis. (Citado por Ortiz-Muñiz G, Sigel MM (1971) Antibody synthesis in lymphoid organs of two marine teleosts. J Reticuloendothelial Soc 9:42-52)
- Hussein MF, Badir N, El Ridi R, Akef M (1978a) Differential effect of seasonal variation on lymphoid tissue of the lizard, Chalcides ocellatus. Dev Comp Immunol 2:297-310.
- Hussein MF, Badir N, El Ridi R, Akef M (1978b) Effect of seasonal variation on lymphoid tissues of the lizards, Mabuya quinquetaeniata Licht. and Uromastix aegyptia Forsk. Dev Comp Immunol 2:469-478.
- Hwang WS, Ho TY, Luk SC, Simon GT (1974) Ultrastructure of the rat thymus. A transmission, scanning electron microscope, and morphometric study in the golden hamster. Lab Invest

31: 473-487.

- Ito T, Hoshino T, Kazuhiro A (1969) The fine structure of the myoid cells in the human thymus. *Arch Histol Jpn* 30:207-215.
- James ES (1939) The morphology of the thymus and its changes with age in the amphibian Necturus maculosus. *J Morphol* 64:445-481.
- Jaroslow BN (1967) Genesis of Hassall's corpuscles. *Nature* 215:408-409.
- Jordan H, Speldel C (1931) Blood formation in the African lungfish, under normal conditions and under conditions of prolonged activation and recovery. *J Morphol* 51:319-371.
- Jordan RK, Crouse DA (1980) Non-lymphoid cells and intrathymic T cell differentiation. En: "Development and differentiation of vertebrate lymphocytes", ed. JD Horton, pp. 47-61, Elsevier North Holland Biomedical Press. Amsterdam
- Kaattari SL, Irwin MJ (1985) Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. *Dev Comp Immun* 9:433-444.
- Kameya T, Watanabe Y (1965) Electron microscopic observations on human thymus and thymoma. *Acta Pathol Jpn* 15:223-246.
- Kampinga J, Kroese FGM, Duijvestijn AM, Murawska MB, Pol GH, Nieuwenhuis P (1987) The rat thymus microenvironment: subsets of thymic epithelial cells defined by monoclonal antibodies. *Transplant Proc* 19:3171-3185.
- Kendall MD (1980) Avian thymus glands: a review. *Dev Comp Immunol* 4:191-209.
- Kendall MD (1981a) Age and seasonal changes in the thymus. En: "The Thymus Gland", ed. MD Kendall, pp. 21-35, Academic Press. London.
- Kendall MD (1981b) Cells of the thymus. En: "The Thymus Gland", ed. MD Kendall, pp. 63-83, Academic Press. London.
- Kendall MD (1991) Functional anatomy of the thymic microenvironment. *J Anat* 177:1-29.
- Kendall MD, Frazier JA (1979) Ultrastructural studies on erythropoiesis in the avian thymus. I. Description of cell types. *Cell Tissue Res* 199:37-61.
- Kendall MD, Singh J (1980) The presence of erythroid cells in the thymus gland of man. *J Anat* 130:183-189.
- Kennedy M, Fitzmaurice P (1972) The biology of the bass Dicentrarchus labrax in Irish waters. *J Mar Biol Assoc UK* 52:557-597.
- Khosla S, Ovalle WK (1986) Morphology and distribution of cystic cavities in the normal murine thymus. *Cell Tissue Res* 246:531-542.

- Kingsbury BF (1928)** On the nature and significance of the thymic corpuscles (of Hassall). *Anat Rec* 38:141-159.
- Klug H (1967)** Submikroskopische Zytologie des thymus von Ambystoma mexicanum. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 78:388-401.
- Kostowiecki M (1962)** Development and degeneration of the second type of Hassall's corpuscles in the thymus of guinea pig. *Anat Rec* 142:195-203.
- Kostowiecki M (1967)** Development of the so-called double-walled blood vessels of the thymus. *Z Mikr Anat Forsch* 77:401-415.
- Kotani M, Fukumoto T, Brandon MR (1981)** Destruction of Hassall's corpuscles by macrophages in the sheep thymus. *Cell Tissue Res* 217:49-54.
- Lagabrielle J (1938)** Contribution à l'étude anatomique histologique et embryonnaire du thymus chez les téléostéens. *Bull Sta Aquicult Alger* 1:1-139.
- Lamers CHJ (1985)** The reaction of the immune system of fish to vaccination. Ph D Thesis, Agricultural University, Wageningen. The Netherlands.
- Leceta J, Villena A, Razquin B, Fonfria J, Zapata A (1984)** Interdigitating cells in the thymus of the turtle Mauremys caspica. Possible relationships to macrophages. *Cell Tissue Res* 238:381-385.
- Le Douarin NM, Dieterlen-Liévre F, Oliver PD (1984)** Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. *Am J Anat* 170:261-299.
- Le Douarin NM, Jotereau FV (1981)** The ontogeny of the thymus. En: "The Thymus Gland", ed. MD Kendall, pp. 133-155, Academic Press. London.
- Lele S (1933)** On the physical history of the thymus gland in plaice of various ages with note on the involution of the organ, including also notes on the ductless glands in this species. *J Univ Bombay* 1:37-53.
- Lieber A (1958)** Der Thymus von Sicyases sanguineus Müller und Troschel. I. Durch Thymektomie bewirkte Veränderung der Körperform. *Morphol Jahrb* 99:498-541.
- Lipsky PE, Rosenthal AS (1973)** Macrophage-lymphocyte interaction: Characteristics of the antigens-independent binding of guinea pig thymocytes and lymphocytes to syngeneic macrophages. *J Exp Med* 138:900-924.
- Lipton JM, Nathan DG (1981)** The role of T lymphocytes in human erythropoiesis. En: "The lymphocyte", eds. KW Sell, WV Miller, pp. 57, AL Liss Inc. New York.
- Longo DL, Schwartz RH (1980)** T-cell specificity for H-2 and Ir gene phenotype correlates with the phenotype of thymic antigen presenting cells. *Nature* 287:144-146.

- Loob CJ, Clem LW (1982) Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulin. *Dev Comp Immunol* 6:473-479.
- MacArdle JF, Roberts RJ (1974) Bilateral hyperplasia of the thymus in a rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Res B Can* 31:1537-1539.
- Mandel T (1968) Ultrastructure of epithelial cells in the cortex of guinea pig thymus. *Z Zellforsch* 92:159-168.
- Mandel T (1970) Differentiation of epithelial cells in mouse thymus. *Z Zellforsch* 106:498-515.
- Manning MJ (1981) A comparative view of the thymus in vertebrates. En: "The thymus gland", ed. MD Kendall, pp 7-20, Academic Press, London.
- Manning MJ, Horton JD (1969) Histogenesis of lymphoid organs in larvae of the South African clawed toad *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morph* 22:265-277.
- Manning MJ, Turner RJ (1976) "Comparative Immunobiology", Blackie. Glasgow.
- Marchalonis JJ (1977) "Immunity in Evolution". Arnold: London. Harvard University Press. Cambridge.
- Marchalonis JJ, Earley EHM, Diener E (1969) Immune response of the tuatara *Sphenodon punctatum*. *Aust J Biol Med Sci* 47:367-380.
- Marshall AHE, White RG (1961) The immunological reactivity of the thymus. *Br J Exp Pathol* 42:379-385.
- Mattisson AGM, Fänge R (1986) The cellular structure of lymphomyeloid tissues in *Chimaera monstrosa* (Pisces, Holocephali). *Biol Bul Mar Biol Lab Woods Hole* 171:660-671.
- Mattisson AGM, Fänge R, Zapata A (1990) Histology and ultrastructure of the cranial lymphohaemopoietic tissue in *Chimaera monstrosa* (Pisces, Holocephali). *Acta Zool Stockh* 71:97-106.
- Maurer F (1886) Schilddrüse und thymus der teleostier. *Morph Jb* 11:129-175.
- Maximow A (1912) Über die embryonale entwicklung der thymus bei elachien. *Arch Mikrosk Anat Entwmech* 80:39.
- Mayer S (1888) Concerning the study of the thyroid gland and thymus in amphibians. *Anat Anz* 3:97.
- McCumber LJ, Sigel MM, Tranger RJ, Cuchens MA (1982) RES structure and function of the fishes. En: "The Reticuloendothelial System. A comprehensive treatise. Vol 3. Phylogeny and ontogeny", eds. N Cohen, MM Sigel, pp. 393-422, Plenum Press. New York.
- McKinney EC, McLeod TF, Sigel MM (1981) Allograft rejection in a fish *Lepisosteus*

- platyrhynchus. Dev Comp Immunol 5:65-75.
- McKinney EC, Ortiz G, Lee JC, Sigel MM, Lopez DM, Epstein RS, McLeod TF (1976) Lymphocytes of fish: multipotential or specialized?. En: "Phylogeny of thymus and bone marrow-bursa cells", eds. RK Wright, EL Cooper, pp.73-82, Elsevier/North-Holland. Amsterdam.
- McLeay DJ (1973) Effects of ACTH on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cell types in juvenile coho salmon, Oncorhynchus kisutch. Gen Comp Endocrinol 21:431-440.
- Meseguer J, Esteban MA, Agulleiro B (1991) Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of the sea bass (Dicentrarchus labrax L.): An ultrastructural study. Arch Histol Cytol 54:299-309.
- Meseguer J, Esteban MA, García Ayala A, López Ruiz A, Agulleiro B (1990) Granulopoiesis in the head-kidney of the sea bass (Dicentrarchus labrax L.): An ultrastructural study. Arch Histol Cytol 53:287-296.
- Miller JFAP (1961) Immunological function of the thymus. Lancet 2:748-749.
- Miller NW, Bly JE, van Ginkel F, Ellsaesser CF, Clem LW (1987) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: Identification and separation of functionally distinct subpopulations of channel catfish lymphocytes with monoclonal antibodies. Dev Comp Immunol 11:739-747.
- Miller NW, Clem LW (1984) Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. J Immunol 133:2356-2359.
- Miller NW, Sizemore RC, Clem LW (1985) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: The cellular requirements for in vitro antibody responses of channel catfish leukocytes. J Immunol 134:2884-2888.
- Millot J, Anthony J, Robineau D (1978) Anatomie de Latimeria chalumnae. III. Editions de Centre National de la Recherche Scientifique, Paris.
- Mimura OM, Mimura I (1977) Timo de Lepidosiren paradoxa (Fitz, 1836). Peize Dipnóico. Bol Fisiol Anim Univ S Paulo 1:29-38.
- Mowry RW (1956) Observations on the use of sulphuric ether for the sulphation of hydroxyl groups in tissue sections. J Histochem Cytochem 4:407.
- Moy-Thomas JA, Miles RS (1971) Paleozoic fishes. Chapman and Hall, London.
- Mulcahy MF (1970) The thymus glands and lymphosarcoma in the pike Esox lucius L. (Pisces; Esocidae) in Ireland. En: "Comparative Leukemia Research 1969", ed. RM Dutcher, Karger. Basel.

- Nagata S (1976) An electron microscopic study on the thymus of larval and metamorphosed toads Xenopus laevis Daudin. J Fac Sci Hokkaido Univ Ser VI Zool 20:263-271.
- Nakamura H, Ayer-Le Lièvre C (1986) Neural crest and thymic myoid cells. Curr Top Dev Biol 20:111-115.
- Nakanishi T (1986) Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissues of the marine teleost, Sebastes marmoratus. Vet Immunol Immunopathol 12:213-221.
- Nakanishi T (1991) Ontogeny of the immune system in the rockfish, Sebastes marmoratus: histogenesis of lymphoid organs and the effects of thymectomy. Environ Fish Biol 30:135-145.
- Navarro V, Quesada J, Abad ME, Taverner N, Rombout JHWM (1993) Immuno(cyto)chemical characterization of monoclonal antibodies to gilthead seabream (Sparus aurata) immunoglobulin. Fish Shellfish Immunol (En prensa).
- Nelson GL (1969) Gill arches and the phylogeny of fishes, with notes on the classification of vertebrates. Bull Amer Mus Nat Hist 141:475-552.
- Oláh I, Röhlich P, Törö I (1975) "Ultrastructure of lymphoid organs", Masson et Cie. Paris.
- O'Neill JG (1989a) Thymic development in two species of marine teleost; an antarctic silverfish, Pleuragramma antarcticum Boulenger, and a warmerwater sea bass, Dicentrarchus labrax (Linnaeus). Proc NIPR Symp Polar Biol. 2:83-93.
- O'Neill JG (1989b) Ontogeny of the lymphoid organs in an Antarctic teleost, Harpagifer antarcticus (Notothemioidei: Perciformes) Dev Comp Immunol 13:25-33.
- O'Neill JG (1989c) Lymphoid organ development in Antarctic teleosts. Antarct Spec Top 77-86.
- Ortiz-Muñiz G, Sigel MM (1971) Antibody synthesis in lymphoid organs of two marine teleosts. J Reticuloendothelial Soc 9:42-52
- Page M (1983) Studies on the Immune System of Lampreys. Ph D Thesis, University of Wales.
- Page M, Rowley AF (1982) A morphological study of pharyngeal lymphoid accumulations in larval lampreys. Dev Comp Immunol Suppl 2:35-40.
- Papermaster BW, Condie RM, Finstad J, Good RA (1964) Significance of the thymus in the evolution of the lymphoid tissue and acquired immunity. En: "The thymus in Immunobiology", eds. RA Good, AE Gabrielsen, pp. 551-593, Hoeber Medical Division. New York.
- Percy R, Potter IC (1977) Changes in haemopoietic sites during the metamorphosis of the lampreys, Lamprera fluviatilis and Lamprera planeri. J Zool Lond 183:111-123.
- Picchio TS (1933) Recherche sul timo di Lophius budegassa (Spin) e sulle sue modificazioni nell

- 'adulto. Arch Ital Anat e Embriol 31:549-568.
- Pulsford AL, Morrow WJW, Fänge R (1984) Structural studies on the thymus of the dogfish, Scyliorhinus canicula L. J Fish Biol 25:353-360.
- Quesada JA, Villena MI, Agulleiro B (1990) Structure of the spleen of the sea bass (Dicentrarchus labrax L.). A light and electron microscopy study. J Morphol 206:273-281.
- Raff MC (1970) Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence. Immunology 19:637.
- Rafn S, Wingstrand KG (1981) Structure of intestine, pancreas and spleen of the Australian lungfish, Neoceratodus forsteri (Kreffl). Zool Scripta 10:223-239.
- Rasquin P, Rosenbloom L (1954) Endocrine imbalance and tissue hyperplasia in teleosts maintained in darkness. Bull Amer Mus Nat Hist 104:359-426.
- Raviola E (1987) Timo. En: "Tratado de Histología", 11ª edición, ed. DW Facett, pp 441-453, Interamericana. Madrid.
- Raviola E, Karnovsky MJ (1972) Evidence for a blood-thymus barrier using electron-opaque tracers. J Exp Med 136:466-497.
- Raviola E, Raviola G (1967) Striated muscle cells in the thymus of reptiles and birds: An electron microscopic study. Am J Anat 121:623-646.
- Razquin BE, Castillo A, Lopez-Fierro P, Alvarez F, Zapata A, Villena AJ (1990) Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson: an immuno- and enzyme-histochemical study. J Fish Biol 36:159-173.
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate of high pH as an electron-opaque in electron microscopy. J Cell Biol 17:208-212.
- Rimmer JJ (1980) Myoid cells and myasthenia gravis: A phylogenetic overview. Dev Comp Immunol 4:385-394.
- Ritter MA, Schuurman HJ, MacKenzie WA, de Maagd RA, Price KM, Broekhuizen R, Kater L (1985) Heterogeneity of human thymus epithelial cells revealed by monoclonal anti-epithelial cell antibodies. En: "Microenvironments in the lymphoid system", ed. GGB Klaus, Adv Exp Med Biol 186:283, Plenum. New York.
- Riviere HB, Cooper EI, Reddy AI, Hildemann WH (1975) In search of the hagfish thymus. Am Zool 15:39-49.
- Rizkalla W (1969) Studies on the thymus of the Nile teleost fish, Clarias lazera C. Acta Vet Ac Sci Hun 19:331-342.
- Roberts RJ (1975) Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. En: "The

- pathology of fishes", eds. WE Ribelin, G Migaki, pp. 399-428, University of Wisconsin Press. Madison.
- Robertson OH, Wexler BC (1960) Histological changes in the organs and tissues of migrating and spawning pacific salmon (Genus: Oncorhynchus). *Endocrinology* 66:222-239.
- Robertson OH, Wexler BC (1962) *Gen Comp Endocr* 2:458-472. (Citado por: Kendall MD (1981a) Age and seasonal changes in the thymus. En: "The Thymus Gland", ed. MD Kendall, pp. 21-35, Academic Press. London.).
- Rojo AL (1988) "Diccionario enciclopédico de anatomía de peces. Monogr Inst Esp Oceanogr nº 3", ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica. Madrid.
- Rombout JHWM, Taverne-Thiele AJ, Villena MI (1993) The gut-associated lymphoid tissue (GATL) of carp (Cyprinus carpio L.): An immunocytochemical analysis. *Dev Comp Immunol* 17:55-66.
- Rosenthal AS, Lipsky PEE, Shevach EM (1975) Macrophage-lymphocyte interaction: morphologic and functional correlates. En "Mononuclear Phagocytes in Immunity, Infection and Pathology", 2ª edición, ed R van Furth, pp 813-825, Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Rowley AF, Hunt TC, Page M, Maiwaring G (1988) Fish. En: "Vertebrate blood cell", eds. AF Rowley, NA Ratcliff, pp. 19-127, Cambridge University Press. Cambridge.
- Ruben LN, Warr GW, Decker JM, Marchalonis JJ (1977) Phylogenetic origins of immune recognition: Lymphoid heterogeneity and the hapten/carrier effect in the goldfish, Carassius auratus. *Cell Immunol* 31:266-283.
- Saad AH, El Ridi R, Zada S, Badir N (1984) Effect of hydrocortisone on immune system of the lizard, Chalcides ocellatus. 1. Response of lymphoid tissues and cells to "in vivo" and "in vitro" hydrocortisone. *Dev Comp Immunol* 8:121-133.
- Sailendri K (1973) Studies on the development of lymphoid organs and immune responses in teleost, Tilapia mossambica (Peters). Ph D Thesis, Madurai University. India.
- Sailendri K, Muthukkaruppan VR (1975a) Immune responses to soluble and cellular antigens in teleost, Tilapia mossambica (Peters). *J Exp Zool* 191:371-383.
- Sailendri K, Muthukkaruppan VR (1975b) Morphology of lymphoid organs in a cichlid teleost, Tilapia mossambica (Peters). *J Morphol* 147:109-122.
- Sainte-Marie G, Peng FS, Marcoux D (1986) The stroma of the thymus of the rat: morphology and antigen diffusion, a reconsideration. *Am J Anat* 177:333-352.
- Salkind J (1915) Contributions histologiques à la biologie comparée du thymus. *Archs Zool Exp Gen* 55:81-322

- Savino W, Santa-Rosa GL (1982) Histophysiology of thymic epithelial reticular cells. Arch Histol Jpn 45:139-144.
- Schaffer T (1893) Über den feineren bau der thymus und deren beziehungen zur blutbildung. Sitzungsber Adak Wiss Wein Math Naturwiss 102:336-341.
- Schmitt D, Monier JC, Dardenne M, Pleau JM, Deschaux P, Bach JF (1980) Cytoplasmic localization of FTS (Facteur thymique serique) in thymic epithelial cells: An immunoelectronmicroscopical study. Thymus 2: 177-186.
- Schneider B (1983) Ontogeny of fish lymphoid organs. Dev Comp Immunol 7(4):739-740.
- Schutte R, Kamperdijk EWA, Hoefsmit ECM (1983) Birbeck granules involved in endocytosis of ferritin-anti-ferritin complexes in thymic interdigitating cells. Cell Biol Int Rep 7:323.
- Scott JE, Dorling J (1965) Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by Alcian blue in salt solutions. Histochemie 5:221-233.
- Secombes CJ, Van Groningen JJM, Egberts E (1983) Separation of lymphocyte subpopulations in carp (*Cyprinus carpio* L.) by monoclonal antibodies: Immunohistochemical studies. Immunology 48:165-175.
- Singh J (1981) The ultrastructure of epithelial reticular cells. En: "The thymus gland", ed MD Kendall, pp. 133-150, Academic Press. London.
- Sizemore RC, Miller NW, Cuchens MA, Lobb CJ, Clem LW (1984) Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: The cellular requirements for *in vitro* mitogenic responses of channel catfish leukocytes. J Immunol 133:2920-2924.
- Sminia T, van Asselt AA, van de Ende MB, Dijkstr CD (1986) Rat thymus macrophages. An immunohistochemical study on fetal, neonatal and adult thymus. Thymus 8:141-152.
- Smith AM, Potter M, Merchant EB (1967) Antibody-forming cells in the pronephros of the teleost, *Lepomis macrochirus*. J Immunol 99:876-882.
- Sokolova AJ (1912) K istorii razbutija thymus'a i sterladi. Obshch Zap Imp Kazan Univ 79:1-33.
- Stannius H (1850) Ueber eine der thymus entsprechende drüse bei knochenfischen. Müller's Arch 501-507.
- Stequert B (1972) Contribution à l'étude du bar *Dicentrarchus labrax* (Linné) des réservoirs à poissons de la région d'Arcachon. Thèse 3ème cycle, Faculte des Sciences, Bordeaux. Francia.
- Sterba G (1953) Die physiologie und histogenese der schilddrüse und des thymus beim bacteunauge (*Lampreta planeri* Bloch-Petromyzon *marinus* Bloch) als grundlagen phylogenetischer studien über die evolution der innersekretorischen kiemendarmderivate. Wiss Z Friedrich-Schiller-Univ Jena Math Naturwiss. 2:239-298.

- Stolen JS, Mäkelä O (1975)** Carrier preimmunisation in the anti-hapten response of a marine fish. *Nature* 254:718-719.
- Sufi GB, Mori K, Nomura T (1980)** Involution of thymus in relation to sexual maturity and steroid hormone treatments in salmonid fish. *Tokoku J Agri Res* 31:97-105.
- Tamura E (1978)** Studies on the morphology of the thymus in some Japanese fishes. Sado Marine Biological Station. Niigata University. Japon. Special Publi Ser 1:1-75.
- Tamura E, Honma Y (1970)** Histological changes in the organs and tissues of the gobiid fishes throughout their life-span. III. Hemopoitic organs in the ice-goby, Leucopsarion petersi Hilgendorf. *Bull Japan Soc Sci Fish* 36:661-669.
- Tamura E, Honma Y (1974)** Histological changes in the organs and tissues of the gobiid fishes throughout their life-span. VI. Seasonal changes in the lymphopoietic organs of the flat-head goby. *Bull Japan Soc Sci Fish* 40:447-455.
- Tamura E, Honma Y (1975)** Histological changes in the organs and tissues of the gobiid fishes throughout their life-span. VII. Seasonal changes of the fork-tongue goby. *Bull Japan Soc Sci Fish* 41:413-422.
- Tamura E, Honma Y (1977)** Histological changes in the organs and tissues of the gobiid fishes throughout their life-span. VIII. Seasonal changes in the thymus of four species of gobies. *Bull Jap Soc Scient Fish* 43:963-974.
- Tamura E, Honma Y, Kitamura Y (1981)** Seasonal changes in the thymus of the viviparus surfperch, Ditrema temmincki, with special reference to its maturity and gestation. *Jpn J Ichthyol* 28:295-303.
- Tatner MF (1985)** The migration of labelled thymocytes to peripheral lymphoid organs in the rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. *Dev Comp Immunol* 9:85-91.
- Tatner MF, Manning MJ (1982)** The morphology of the trout, Salmo gairdneri Richardson, thymus: some practical and theoretical considerations. *J fish Biol* 21:27-32.
- Tatner MF, Manning MJ (1983a)** The ontogeny of cellular immunity in the rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson, in relation to the stage of development of the lymphoid organs. *Dev Comp Immunol* 7:69-75.
- Tatner MF, Manning MJ (1983b)** Growth of the lymphoid organs in rainbow trout, Salmo gairdneri, from one to fifteen months of age. *J Zool Lond* 199:503-520.
- Thuvander A, Fossum C, Lorenzen N (1990)** Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulin: Characterization and applicability in immunoassays. *Dev Comp Immunol* 14:415-423.
- Törö I, Oláh I (1966)** Electron microscopic study of guinea pig thymus. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 14:275-290.

- Törö I, Oláh I, Röhlich P, Viragh SZ (1969)** Electron microscopic observations on myoid cells of the frog's thymus. *Anat Record* 165:329-342.
- Toussaint-Demylle D, Scheiff JM, Haumont S (1990)** Thymic nurse cells: Morphological study during their isolation from murine thymus. *Cell Tissue Res* 261:115-123.
- Trainin N (1974)** Thymic hormones and the immune response. *Physiol Rev* 54:272-315.
- Vacca LL (1985)** Laboratory manual of histochemistry, ed. Raven Press Books, New York.
- Van de Wijngaert FP, Kendall MD, Schuurman HJ, Rademakers LHPM, Kater L (1984)** Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 237:227-237.
- Van de Wijngaert FP, Rademakers LHPM, Schuurman HJ, De Weger RA, Kater L (1983)** Identification and in situ localization of the thymic nurse cell in man. *J Immunol* 130:2348-2351.
- Van Diepen JCE, Wagenaar GTMW, Rombout JHWM (1991)** Immunocytochemical detection of membrane antigens of carp leucocytes using light and electron microscopy. *Fish Shellfish Immunol* 1:47-57.
- Van Ewijk W (1988)** Cell surface topography of thymic microenvironments. *Lab Invest* 59:579-590.
- Van Loon JJA, Secombes CJ, Egberts E, Van Muiswinkel WB (1982)** Ontogeny of the immune system in fish. Role of the Thymus. En: "In vivo immunology", eds. P Nieuwenhuis, AA Van Den Broek, MG Hanna, pp. 335-341, Plenum Press. New York.
- Van Muiswinkel WB, Cooper EL (1982)** "Immunology and immunization of fish", *Dev Comp Immunol Suppl* 2, Pergamon Press. Oxford.
- Van Muiswinkel WB, Lamers CHJ, Rombout JHWM (1991)** Structural and functional aspects of the spleen in bony fish. *Res Immunol* 142:362-366.
- Van Muiswinkel WB, Rijkers GT, Van Oosterom R (1978)** The origin of vertebrate immunity. The lymphoid system in fish. *Proc ZODIAC Simp Adaptation*, pp. 84-87, Wageningen. The Netherlands.
- Veldman JE, Kaiserling E (1980)** Interdigitating cells. En: "The reticuloendothelial system. A comprehensive treatise. Vol 1. Morphology", eds. I Carr y WT Daems, pp. 381-416, Plenum, New York.
- Villena MI (1992)** Ontogénesis del bazo de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Estudio microscópico óptico y ultraestructural. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. Murcia. España.
- Von Gaudecker B, Steinmann GG, Hansmann ML, Harprecht J, Milicevic NM, Müller-Hermelink HK (1986)** Immunohistochemical characterization of the thymic microenvironment. *A*

- light-microscopic and ultrastructural immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 244:403-412.
- Von Hagen F (1936) Die wichtigsten endokrinen des flussaals. *Zool Jb* 61:467-538.
- Ward P, Kendall MD (1975) Morphological changes in the thymus of young and adult red-billed queleas *Quelea quelea* (Aves). *Phil Trans R Soc B* 273:55-64.
- Warr GW, DeLuca D, Marchalonis JJ (1976) Phylogenetic origins of immune recognition: Lymphocyte surface immunoglobulins in the goldfish *Carassius auratus*. *Proc Nat Acad Sci USA* 73:2476-2480.
- Warr GW, DeLuca D, Decker JM, Marchalonis JJ, Ruben LN (1977) Lymphoid heterogeneity in teleost fish: Studies on the genus *Carassius*. En "Developmental immunobiology" ed JB Solomon y JD Horton. Amsterdam, Elsevier, 241-248.
- Warr GW, DeLuca D, Griffin R (1979) Membrane immunoglobulin is present on thymic and splenic lymphocytes of the trout, *Salmo gairdneri*. *J Immunol* 123:910-917.
- Warr GW, Marchalonis JJ (1982) Molecular basis of self/nonself discrimination in the ectothermic vertebrates. En: "Phylogeny and ontogeny", eds. N Cohen, MM Siegel, pp. 541-567, Plenum Press. New York.
- Warr GW, Simon RC (1983) The mitogen response potential of lymphocytes of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) re-examined. *Dev Comp Immunol* 7:379-384.
- Warr GW, Vasta GR, Marchalonis JJ, Allen RC, Anderson DP (1984) Molecular analysis of the lymphocyte membrane. *Dev Comp Immunol* 8:757-772.
- Watson ML (1958) Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *B Biophys Biochem Cytol* 4:475.
- Weiss E, Avtalion RR (1977) Regulatory effect of temperature and antigen upon immunity in ectothermic vertebrates. II. Primary enhancement of anti-hapten antibody response at high and low temperatures. *Dev Comp Immunol* 1:93-104.
- Weiss L (1963) Electron microscopic observations on the vascular barrier in the cortex of the thymus of the mouse. *Anat Rec* 145:413-438.
- Weiss L (1988) The thymus. En: "Cell and tissue biology. A textbook of histology", 6ª edición, ed. L Weiss, pp. 479-495, Urban & Schwarzenberg. Baltimore-Munich.
- Wekerle H, Ketelsen UP (1980) Thymic nurse cells- Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation?. *Nature* 283:402-404.
- Whitehead PJP, Bauchot ML, Huerau JC, Nielsen J, Tortonese E (1986) "Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean. Vol II", ed., UNESCO. Paris.

-
- Yamaga KM, Kubo RT, Etlinger HM (1978a)** Studies on the question of conventional immunoglobulin on thymocytes from primitive vertebrates. I. Presence of anti-carbohydrate antibodies in rabbit anti-trout immunoglobulin sera. *J Immunol* 120:2068-2073.
- Yamaga KM, Kubo RT, Etlinger HM (1978b)** Studies on the question of conventional immunoglobulin on thymocytes from primitive vertebrates. II. delineation between immunoglobulin-specific and cross-reactive components. *J Immunol* 120:2074-2079.
- Yocum D, Cuchens M, Clem LW (1975)** The hapten-carrier effect in teleost fish. *J Immunol* 114:925-927.
- Yoffey JM (1981)** Stem cells and the thymus with special reference to cellular migration streams. En: "The thymus gland", ed. MD Kendall, pp. 185-202, Academic Press. London.
- Zapata A (1980)** Ultrastructure of elasmobranch lymphoid tissue. 1. Thymus and spleen. *Dev Comp Immunol* 4:459-472.
- Zapata A (1981)** Lymphoid organs of teleost fish. I. Ultrastructure of the thymus of Rutilus rutilus. *Dev Comp Immunol* 5:427-436.
- Zapata A (1983)** Phylogeny of the fish immune system. *Bull Inst Pasteur* 81:165-186.
- Zapata AG, Cooper EL (1990)** The thymus. En: "The immune system: comparative histophysiology", pp. 104-149. J Wiley & Sons Inc. New York.
- Zinkernagel RM, Callahan GN, Althage A, Cooper S, Klein PA, Klein J (1978)** On the thymus in the differentiation of H-2 self-recognition by T cells: evidence for dual recognition?. *J Exp Med* 147:882-911.